

**Das Verhalten des Resistenzfaktors RP4 aus
Pseudomonas aeruginosa in dem Boden-
bakterium *Rhizobium lupini* und in dem
Enterobakterium *Escherichia coli***

Dr. Alfred Pühler

1976

1977 № 106



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Das Verhalten des Resistenzfaktors RP4 aus
Pseudomonas aeruginosa in dem Boden-
bakterium Rhizobium lupini und in dem
Enterobakterium Escherichia coli**

Dem Fachbereich Biologie-Chemie
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
als Habilitationsschrift

vorgelegt
von
Dr. Alfred Pühler
aus
Erlangen

1976

Das Verhalten des Resistenzfaktors RP4 aus Pseudomonas
aeruginosa in dem Bodenbakterium Rhizobium lupini
und in dem Enterobakterium Escherichia coli

A. Pühler, Institut für Mikrobiologie der Friedrich-
Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg

	Seite
<u>Einführung</u>	3
<u>Teil I</u>	
Das Verhalten des Resistenzfaktors RP4 in dem Bodenbakterium <u>Rhizobium lupini</u>	7
<u>Teil II</u>	
Die Fertilitätsinhibierung in <u>Rhizobium</u> <u>lupini</u> durch transferdefekte RP4-Faktoren	62
<u>Teil III</u>	
Abspaltung einer transferierbaren Ampicillin- resistenz vom RP4-Faktor in <u>Escherichia coli</u>	86
<u>Teil IV</u>	
Transposition einer transferierbaren Ampicillin- resistenz vom RP4-Faktor auf das Genom des P1- Phagen in <u>Escherichia coli</u>	117
<u>Teil V</u>	
Kompatibilitätsuntersuchungen zwischen dem RP4- Faktor und den von ihm abgeleiteten R-Faktoren	147
<u>Schlußbetrachtung</u>	173
<u>Anhang I</u>	
Zusammenstellung der Abkürzungen	176
<u>Anhang II</u>	
Literaturverzeichnis	179

Einführung

Die Existenz von bakteriellen Resistenzfaktoren (R-Faktoren) wurde erstmals 1960 in Japan (Ochiai et al., 1959; Akiba et al., 1960) nachgewiesen und anschließend auch in anderen Ländern beobachtet: England (Datta, 1962), Deutschland (Lebek, 1963), Frankreich (Chabbert und Baudens, 1965) und Vereinigte Staaten (Kabins und Cohen, 1966). Es handelt sich dabei um genetische Elemente, die extrachromosomal in der Bakterienzelle vorliegen (Novick, 1969; Goebel, 1973). Sie tragen meist eine Reihe von Antibiotikaresistenzen und vermitteln so ihrer Wirtszelle die Fähigkeit, in Gegenwart bestimmter Antibiotika zu überleben (Benveniste und Davies, 1973). Viele dieser R-Faktoren zeichnen sich zusätzlich durch eine Resistenztransfereinheit (RTF-Einheit) aus, die die Information für den Konjugationstransfer des R-Faktors beinhaltet (Watanabe, 1963; Meynell et al., 1968). R-Faktoren mit einer RTF-Einheit können sich demnach in einer Bakterienpopulation epidemisch ausbreiten. Diese letztgenannte Eigenschaft interferiert vor allem im klinischen Bereich mit der Bekämpfung von bakteriellen Infektionskrankheiten durch Antibiotika, da pathogene Keime über einen Konjugationsvorgang leicht R-Faktoren erwerben und sich damit einer Antibiotikabehandlung widersetzen können (Lebek, 1969). Neben diesem medizinischen Aspekt gewinnen R-Faktoren in letzter Zeit aber auch auf dem genetischen Sektor immer mehr an Bedeutung, da sie als Trägerplasmide für Fremdgene verwendet werden können. Sie lassen sich aus der Bakterienzelle isolieren und anschließend in vitro manipulieren. Darunter versteht man das Öffnen des ringförmigen DNA-Moleküls und das Einfügen von ausgesuchten Fremdgenen. Solche Moleküle erlangen anschließend nach Rückverpflanzung in die Bakterienzelle ihre volle biologische Aktivität. Damit können Auswirkungen studiert werden, die das eingefügte Fremdgen auf die Wirtszelle des R-Faktors ausübt (Klingmüller, 1975). Diese beiden Aspekte

machen verständlich, warum in letzter Zeit die Untersuchungen auf dem R-Faktor-Gebiet so intensiviert wurden.

Viele R-Faktoren sind bezüglich ihres Wirtsbereichs mehr oder weniger eingengt. Durch Datta et al. (1971) wurde erstmals ein universeller R-Faktor beschrieben, der innerhalb aller bisher getesteten gram⁻ Bakterien übertragen werden konnte. Dieser enorme Wirtsbereich verleiht dem RP4-Faktor eine Sonderstellung und ermöglicht Untersuchungen, die sein Verhalten sowohl in Entero- als auch in Bodenbakterien analysieren. Über die Herkunft dieses RP4-Faktors, der zur Kompatibilitätsklasse P gehört, hat es einige Verwirrung gegeben. Es wird heute jedoch angenommen, daß der in dieser Arbeit verwendete RP4-Faktor auf den P.aeruginosa Stamm 1822 zurückgeht (Holloway und Richmond, 1973), der vor längerer Zeit in Birmingham, England, isoliert wurde (Lowbury et al., 1969). Dieser P.aeruginosa Stamm 1822 trägt extrachromosomal codierte Resistenzen gegen Carbencillin, Neomycin/Kanamycin und Tetracyclin, für die je nach Labor ein R-Faktor mit folgender Bezeichnung verantwortlich gemacht wurde:

RP4	(<u>Datta et al.</u> , 1971)
RP1	(<u>Grinsted et al.</u> , 1972)
R1822	(<u>Olsen</u> und <u>Shipley</u> , 1973)
R18	(<u>Chandler</u> und <u>Krishnapillai</u> , 1974)

Diese R-Faktoren sind, falls sie in den einzelnen Labors keine Veränderungen erfahren haben, als identisch anzusehen.

Der molekulare Nachweis eines R-Faktors aus dem Stamm P.aeruginosa 1822 wurde von mehreren Autoren geführt: Grinsted et al., (1972) isolierte das RP1-Molekül aus verschiedenen Bakterien und bestimmte mit Zentrifugationsmethoden das Molekulargewicht (40×10^6 Daltons) und die

Dichte der RP1-DNA ($1,719 \text{ g/cm}^3$). Mattes (1974) untersuchte den RP4-Faktor in R.lupini. Er fand für den RP4-Faktor ein dem RP1-Faktor analoges Sedimentationsverhalten im Sucrosegradienten. Burkardt (1974) analysierte schließlich RP4- und RP1-DNA aus verschiedenen Wirtsbakterien im Elektronenmikroskop und fand für beide Spezies jeweils eine Länge von $19,1 \mu\text{m}$.

In der Zwischenzeit sind über den Resistenzfaktor aus dem P.aeruginosa-Stamm 1822 mehrere interessante Arbeiten erschienen: Stanisich und Holloway (1971) berichteten über die Initiierung des chromosomalen Gentransfers in P.aeruginosa durch den R1822-Faktor. O'Gara und Dunican (1973) untersuchten den RP4-Faktor nach Transformation in Rhizobium trifolii. Olsen und Shipley (1973) stellten den Wirtsbereich und die Eigenschaften von R1822 zusammen. Olsen und Thomas (1973) isolierten den RNS-Phagen PRR1, der eine P.aeruginosa- oder E.coli-Zelle nur dann lysiert, wenn sie den R-Faktor R1822 oder einen anderen R-Faktor der Klasse P trägt. Es wird angenommen, daß der PRR1-Phage als Adsorptionsstelle den RP-spezifischen Pilus benützt (Bradley, 1974). Berenger (1974) transferierte den RP4-Faktor nach Rhizobium leguminosarum und untersuchte dort seine Eigenschaften. Olsen und Gonzalez (1974) konnten nachweisen, daß der RP1-Faktor die Gene des his-Operons aus E.coli nach artfremden Bakterien transferieren kann. Cho et al., (1975) transferierte den RP1-Faktor nach pflanzenpathogenen Erwinia-Arten und Panopoulos et al., (1975) untersuchten RP1 in pflanzenpathogenen Pseudomonas-Arten.

In der vorliegenden Arbeit wird das Verhalten des RP4-Faktors in dem Bodenbakterium R.lupini und dem Enterobakterium E.coli beschrieben. In R.lupini liegt der RP4-Faktor instabil vor. Von ihm entstehen spontan und mit hoher Effektivität Mutanten, die entweder die RTF-Einheit oder die r-Determinante betreffen. Zusätzlich bewirkt der

RP4-Faktor eine Inhibierung der R.lupini-eigenen Fertilität. RP4-Mutanten, die diese Fertilitätsinhibierung nicht mehr besitzen, konnten isoliert werden. In E.coli können diese Eigenschaften nicht beobachtet werden. Dort liegt der RP4-Faktor stabil vor und bildet keine Mutanten aus. In E.coli spaltet der RP4-Faktor aber eine isoliert auftretende Ampicillinresistenz ab, die sich als transmissibel erwies. Diese Ampicillinresistenz konnte auch auf das Genom des Phagen P1 verlegt werden. Mit Kompatibilitätsexperimenten wurde die Verwandtschaft dieser isoliert auftretenden Ampicillinresistenz zum RP4-Faktor untersucht.

Teil I :

Das Verhalten des Resistenzfaktors RP4 in dem
Bodenbakterium Rhizobium lupini

I	Das Verhalten des Resistenzfaktors RP4 in dem Bodenbakterium <u>Rhizobium lupini</u>	7
I A	<u>Zusammenfassung</u>	10
I B	<u>Einleitung</u>	11
I C	<u>Material und Methoden</u>	12
I D	<u>Ergebnisse</u>	19
I D 1	Resistenzeigenschaften von <u>R.lupini</u> -Stämmen	19
I D 1.1	Resistenzverhalten von <u>R.lupini</u> -Stämmen vor Erwerb des RP4-Faktors	19
I D 1.2	Resistenzverhalten von <u>R.lupini</u> -Stämmen nach RP4-Erwerb	21
I D 1.3	Folgerungen aus dem Resistenzverhalten von <u>R.lupini</u> -Stämmen vor und nach Erwerb des RP4-Faktors	21
I D 2	RP4-Transfer zwischen <u>R.lupini</u> -Stämmen	24
I D 2.1	Kreuzungsmethoden	24
I D 2.2	Bedingungen für den RP4-Transfer: Abhängigkeit von der Wachstumsphase des Donor- und Rezipientenstammes	25
I D 3	Inhibierung der <u>R.lupini</u> -Fertilität durch den RP4-Faktor	28
I D 3.1	Qualitativer Nachweis der Fertilitätsinhibierung durch den RP4-Faktor	28
I D 3.2	Quantitativer Nachweis der Fertilitätsinhibierung durch den RP4-Faktor	32
I D 3.3	Rückgewinnung der Fertilität nach RP4-Verlust	34
I D 4	RP4-initiiertes, chromosomales Gentransfer in <u>R.lupini</u>	36
I D 5	Instabilität des RP4-Faktors in <u>R.lupini</u>	40
I D 6	Transferdefekte RP4-Faktoren in <u>R.lupini</u>	43
I D 6.1	Nachweis transferdefekter RP4-Faktoren	43

		Seite
I D 6.2	Übertragungstest transferde- fekter RP4-Faktoren von <u>R.lupini</u> nach <u>E.coli</u>	45
I D 7	RP4-Mutanten mit verkürzter r- Determinante	48
I D 7.1	Nachweis von ampicillin- oder kana- mycinsensitiven, RP4-tragenden <u>R.lupini</u> -Stämmen	48
I D 7.2	Transfer von RP4-Mutanten mit ver- kürzter r-Determinante von <u>R.lupini</u> nach <u>E.coli</u>	50
I E	<u>Diskussion</u>	52
I E 1	RP4-Transfer zwischen <u>R.lupini</u> - Stämmen	52
I E 2	Inhibierung der <u>R.lupini</u> -Fertilität durch den RP4-Faktor	54
I E 3	Initiierung des chromosomalen Gen- transfers durch den RP4-Faktor in <u>R.lupini</u>	56
I E 4	Das DNA-Degradationsmodell für den RP4-Faktor in der <u>R.lupini</u> -Zelle	56

Der Resistenzfaktor RP4 mit seinen Resistenzen gegen Ampicillin, Kanamycin und Tetracyclin wurde in dem Bodenbakterium Rhizobium lupini genetisch analysiert. Eine RP4-tragende R.lupini-Zelle transferiert den RP4-Faktor bevorzugt in der log-Phase, während eine Rezipientenzelle den RP4-Faktor sowohl in der log- als auch in der Stationärphase aufnehmen kann.

Der RP4-Faktor inhibiert die R.lupini-eigene Fertilität: Nach Erwerb des RP4-Faktors ist eine R.lupini-Donorzelle zu keinem chromosomalen Gentransfer mehr fähig. Dieser chromosomale Gentransfer wird nach Verlust des RP4-Faktors aber wieder rekonstituiert. Andererseits mobilisiert der RP4-Faktor in R.lupini einen geringen chromosomalen Gentransfer.

Der RP4-Faktor liegt in R.lupini instabil vor und wird in diesem Wirt genetisch stark modifiziert: ohne speziellen Selektionsdruck wurden von diesem RP4-Faktor Mutanten isoliert, die sowohl die RTF-Einheit als auch die r-Determinante betreffen. Es wird vermutet, daß diese Mutanten durch Deletionen im R-Faktormolekül entstanden sind.

Der RP4-Faktor aus dem P.aeruginosa-Stamm 1822 (Holloway und Richmond, 1973) zeichnet sich durch seinen großen Wirtsbereich aus. Er kann sich sowohl in Entero- als auch in Bodenbakterien etablieren (Datta et al., 1971; Mattes et al., 1973; O'Gara und Dunican, 1973; Berenger, 1974). In E.coli wurde die erste ausführliche Analyse des RP4-Faktors durchgeführt (Datta et al., 1971). Für ihn wurde die neue Kompatibilitätsklasse P geschaffen, da er sich mit allen bekannten R-Faktorklassen als kompatibel erwies. Außerdem zeigte der RP4-Faktor fi^- Charakter, d. h., die E.coli-Fertilität wird von ihm nicht beeinflusst.

Aufgrund seines großen Wirtsbereichs besteht die Möglichkeit, das Verhalten des RP4-Faktors in Bodenbakterien zu untersuchen. Hierfür eignet sich besonders Rhizobium lupini, dessen Konjugationssystem gut untersucht ist (Heumann, 1968; Heumann et al., 1971; 1973). Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, daß der RP4-Faktor in R.lupini vollkommen neue Eigenschaften entwickelt. Er liegt instabil vor und bildet in diesem Wirt Mutanten aus, die sowohl die Transfereinheit als auch die r-Determinante betreffen. Außerdem inhibiert er die R.lupini-eigene Fertilität und initiiert einen geringen chromosomalen Gentransfer.

I C Material und Methoden

I C 1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten R.lupini-Stämme sind in Tabelle I zusammengefaßt. Sie sind entweder in den Arbeiten von Heumann (1968) und Pühler (1971) beschrieben oder leiten sich direkt aus den dort aufgeführten Stämmen her. Die benützten genetischen Abkürzungen wurden entsprechend einem Vorschlag von Demerec et al. (1966) gewählt. Die Lage der genetischen Markierungen auf dem R.lupini-Chromosom kann der Arbeit von Heumann et al. (1973) entnommen werden. Im Text der einzelnen Versuche werden die relevanten genetischen Markierungen der verwendeten Stämme wiederholt.

Tabelle I: Rhizobium lupini Stämme

Laborbezeichnung	Fertilität		Auxotrophie	Farbmarkierung	sonstige Markierung
	Fc	Fd			
1-250	+	+	prt	car-y	
1-44	+	+	thi	car-1	
1-491	+	+	thi	car-1	str-r
1-489	+	+	thi	car-y	str-r
1-595	-	-	ade	car-y	
1-482	-	+	cys	car-1	str-r
1-480	-	+	cys	car-y	str-r
1-486	-	+	ilv	car-y	
1-488	-	+	ilv	car-1	str-r
1-624	+	+	ilv	car-y	str-r
1-20	-	+	his	car-1	str-r
1-20 rev	-	+	prt	car-1	
1-596	-	-	his	car-p	
1-723	-	-	pro	car-y	
1-793	-	-	thr	car-y	

Der Wildtypstamm 1-250 zeigt eine starke Sternbildung (sta^+ -Eigenschaft), d. h. individuelle Zellen dieses Stammes kleben zusammen und setzen sich im Flüssigmedium ab (Heumann, 1968). Diese Zellsterne können auch durch starkes Schütteln nicht getrennt werden. Da Sternbildung beim quantitativen Arbeiten mit R.lupini-Stämmen stört, wurden in dieser Arbeit grundsätzlich sta^- -Mutanten (Mayer, 1969) benutzt. Nur bei den ausdrücklich mit " sta^+ " gekennzeichneten Stämmen wurde von dieser Regel abgewichen.

Neben den angegebenen R.lupini-Stämmen wurde in dieser Arbeit noch der E.coli-Wildtypstamm K12 verwendet, der aus dem Labor von Prof. Dr. R. Schmitt (Universität Regensburg) stammt.

I C 2 Der Resistenzfaktor RP4

Der Resistenzfaktor RP4 mit seinen Resistenzen gegen Ampicillin, Kanamycin/Neomycin und Tetracyclin wurde von Dr. Hedges (1971) auf unseren R.lupini-Stamm 1-250 übertragen. 1-250 (RP4) diente als Ausgangsstamm für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente. Die Methoden des RP4-Transfers zwischen R.lupini-Stämmen werden in Punkt I D 2.1 ausführlich dargestellt.

I C 3 Der RNA-Phage PRR1

Der RP-spezifische RNA-Phage PRR1 wurde uns von Dr. Olsen (Michigan, USA) zur Verfügung gestellt. Er wurde mittels Plattenlysats auf dem Stamm E.coli K12 (RP4) vermehrt. Dazu wurden 0,1 ml einer Ü-Kultur von K12 (RP4) mit 0,1 ml eines PRR1-Lysates (Titer 10^8) gemeinsam auf einer PA-Platte ausgespatelt und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag wurde diese Platte mit 2 ml Phagenpuffer (NaCl 0,07 M, KH_2PO_4 0,02 M, Na_2HPO_4 0,04 M, $\text{pH} = 6,8$) abgeschwemmt, zur

Sterilisation mit einigen Tropfen Chloroform versehen und
niedertourig abzentrifugiert (10 000 U/min und 10 min.)
Der Oberstand enthielt meist 10^{10} pfu.

I C 4 Medien und Zusätze

Als Grundmedien wurden verwendet:

NB: Nutrient Broth

PA: Penassay

MM: Minimalmedium (Heumann, 1968)

Diesen Medien wurden je nach Experiment unterschiedliche
Supplemente zugesetzt.

R.lupini-Konjugation:

Das Kreuzungsmedium besteht aus MM mit einem 1%-igen Zusatz
an NB (Heumann, 1968)

Antibiotikamedien für den Resistenztest RP4-tragender R.lupini-
Stämme: (siehe auch Punkt I D 1.3)

Zusätze: Ampicillin 400 µg/ml

Kanamycin 30 µg/ml

Tetracyclin 40 µg/ml

Antibiotikamedien für den Resistenztest RP4-tragender E.coli-
Stämme: (Datta et al., 1971)

Zusätze: Ampicillin 100 µg/ml

Kanamycin 25 µg/ml

Tetracyclin 10 µg/ml

Antibiotikamedien für den Transfertest des RP4-Faktors
zwischen R.lupini-Stämmen:

Zusätze: Kanamycin 30 µg/ml

Tetracyclin 2 µg/ml

Streptomycinzusatz zur Gegenselektionierung von Donorstämmen

Zusatz: Streptomycin 200 µg/ml

Festmedien enthielten 18 g Agar pro 1 l Flüssigmedium.

I C 5 Chemikalien

Nutrient Broth: Difco, Detroit, USA
Penassay: " " "
Agar: " " "
Ampicillin: Höchst, Frankfurt
Kanamycin: Grunenthal, Stolberg / Rheinland
Tetracyclin: Höchst, Frankfurt
Streptomycin: Serva, Heidelberg

I C 6 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Antibiotika

Von den einzelnen Antibiotika wurde eine geometrische Konzentrationsreihe in Reagenzröhrchen mit je 10 ml NB-Medium hergestellt. Diese Röhrchen wurden mit 0,1 ml einer Ü-Kultur des zu untersuchenden Stammes beimpft und bei Zimmertemperatur in einem Rotator bebrütet. Das Wachstum der Bakterienkulturen in den einzelnen Röhrchen wurde mittels "optischer Dichte"-Messung verfolgt. Dazu diente ein Spectronic 20 Gerät (Bausch und Lomb), das bei einer Wellenlänge von 580 nm betrieben wurde. Falls die Kontrolle ohne Antibiotikazusatz die Stationärphase erreicht hatte ($OD \approx 1,5$), wurde der MHK-Wert bestimmt. Hierbei handelt es sich um die niedrigste Antibiotikakonzentration, die ein Wachstum von einer optischen Dichte $< 0,1$ erlaubt.

I C 7 Penicillinase nachweis auf Festmedium

Die zu untersuchenden Stämme wurden als Strichkolonien auf Festagar mit einem Stärkezusatz von 2% ausgestrichen und anschließend inkubiert. Nach dem Anwachsen der Kolonien wurde der Nachweis einer ins Medium ausgeschiedenen Penicillinase nach der jodometrischen Methode von Perret (1954) ausgeführt. Dazu wurden Platten mit einer frisch angesetzten Lösung aus 6 ml Phosphatpuffer (pH = 6,4) und 400 mg Ampicillin über-

schwemmt und bei 4° C für 15 min stehengelassen. Anschließend wurde eine Lösung von 2ml 0,1 N Jodlösung und 80 mg Kaliumjodid überschichtet. Auf Grund der Jod-Stärke-Reaktion färbt sich das Medium blau. Diese Blaufärbung wird in Gegenwart von Penicillinase verhindert, da das Enzym Penicillin in Penicilloinsäure umwandelt und diese wiederum mit Jod reagiert. Penicillinaseproduzierende Strichkolonien konnten also anhand nicht gefärbter Höfe erkannt werden.

I C 8 RP4-Transfer

Ü-Kulturen des RP4-Donor- und RP4-Rezipientenstammes wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und davon 0,1 ml auf NB-Platten ausgespatelt, die dann bei 30° C über Nacht bebrütet wurden. Das Kreuzungsgemisch dieser Platten wurde am nächsten Tag mit 2 ml Wasser abgeschwemmt und eine Verdünnungsreihe davon auf selektive Medien ausgespatelt. RP4-tragende Rezipientenkolonien erschienen nach zwei bis drei Tagen bei 30° C.

I C 9 "Interrupted mating"-Methode zur Analyse des RP4-Transfers

RP4-Donor und RP4-Rezipient wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ auf eine Reihe von NB-Platten ausgespatelt und bei 30° C bebrütet. Nach verschiedenen Zeiten wurde jeweils das Kreuzungsgemisch einer Platte durch Abschwemmen mit 2 ml Wasser geerntet, 2 min lang auf dem Vortexmixer geschüttelt und eine Verdünnungsreihe davon auf selektive Medien ausgespatelt. Da bei diesen Kreuzungen stets ein str-s RP4-Donor und ein str-r Rezipient Verwendung fanden, konnte zur Gegenselektion des Donors Streptomycin verwendet werden. Als selektive Medien dienten NB + Kan + Str und NB + Tet + Str.

I C 10 R. lupini-Konjugation

Vollkreuzung: Von Ü-Kulturen der auxotroph markierten Elternstämme wurden Mischstufen ($0,10^{-1}$, 10^{-2} usw.) hergestellt und von diesen 0,1 ml auf Minimalagar ausgespatelt. Diese

Platten wurden bei 30° C bis zu einer Woche bebrütet. Zur Herstellung der Mischstufen wurden jeweils 0,1 ml Rezipientenkultur mit 0,1 ml der entsprechenden Verdünnungsstufe (10^{-1} , 10^{-2} usw.) des Donorstammes gemischt. Dadurch wurde sichergestellt, daß jede Donorzelle in den einzelnen Mischstufen mit der gleichen Wahrscheinlichkeit eine Rezipientenzelle fand.

Schnellkreuzung: Zur Schnellkreuzung wurden Ü-Kulturen der beiden Elternstämme mit der Öse auf Minimalagar gegeneinander ausgestrichen und nach dem Eintrocknen bei 30° C bebrütet. Im Mischbereich der beiden Elternstämme können sich Rekombinantenkolonien entwickeln.

I C 11 Resistenztest

Einzel- oder Strichkolonien der zu testenden Stämme wurden auf antibiotikahaltige Platten gestempelt und diese nach 2-tägiger Inkubation bei 30° C abgelesen. Normales Kolonienwachstum zeigte die entsprechende Antibiotikaresistenz an.

I C 12 Fertilitätstest

Einzel- oder Strichkolonien eines auxotrophen R.lupini-Stammes wurden auf einen auxotrophen R.lupini-Rezipientenrasen gestempelt, der sich auf Minimalagar befand. Die Stempelplatten wurden bei 30° C bebrütet. Entwickelten sich an den Stellen der Stempelabdrücke Rekombinantenkolonien, so handelt es sich bei den überstempelten Einzel- oder Strichkolonien um fertile Stämme, also um Stämme mit Donoreigenschaft. Zur Herstellung des Rezipientenrasens wurden 0,1 ml aus einer frischen Ü-Kultur auf Minimalagar ausgespatelt. Nach kurzem Antrocknen wurden diese Platten für den Stempeltest verwendet.

I C 13 RP4-Transfertest

Einzel- oder Strichkolonien eines auxotrophen, RP4-tragenden R.lupini-Stammes wurden auf einen prototrophen R.lupini-Rezipientenrasen gestempelt, der sich auf Minimalagar mit Antibiotikazusatz befand (MM + NB + Kan oder MM + NB und Tet). Nur prototrophe, RP4-tragende Kolonien konnten auf diesen Medien wachsen. Wachstum des Rezipientenrasens zeigte also den erfolgten RP4-Transfer an und kennzeichneten den entsprechenden RP4-Faktor der Ausgangskolonie als transmissibel. Zur Herstellung des Rezipientenrasens wurden wiederum 0,1 ml einer frischen O-Kultur verwendet. Die Antibiotikakonzentration in den Minimalagarplatten mußte diesem Testverfahren angepaßt werden, da der antibiotikasensitive Rezipientenstamm in Gegenwart von Antibiotika den RP4-Faktor aufnehmen, ihn etablieren und die entsprechende Antibiotikaresistenz ausprägen muß. Im Fall von Tetracyclin wurde deshalb eine Konzentration von 2 µg/ml verwendet. Bei Kanamycin konnte mit 30 µg/ml gearbeitet werden.

I C 14 Test auf PRR1-Sensitivität

O-Kulturen der zu testenden Stämme wurden mit der Öse auf PA-Platten als Striche aufgetragen. Nach dem Antrocknen wurden diese mit PRR1-Suspension (Titer 10^9 pfu) quergestrichen. Bei PRR1-Sensitivität ergibt sich im Bereich des Querstriches eine deutliche Hemmzone des Bakterienwachstums.

I D Ergebnisse

I D 1. Resistenzeigenschaften von R.lupini-Stämmen

Resistenzfaktoren werden gewöhnlich an Hand ihres Resistenzspektrums nachgewiesen. Man studiert dazu die Resistenzeigenschaften von Bakterienstämmen vor und nach Erwerb von R-Faktoren. Ziel dieser Arbeit soll es sein, das Verhalten des Resistenzfaktors RP4 in dem Bodenbakterium R.lupini aufzuklären. Zu diesem Zweck haben wir zunächst das Resistenzverhalten von R.lupini-Stämmen mit und ohne RP4-Faktor gegenüber Ampicillin, Kanamycin und Tetracyclin untersucht.

I D 1.1 Resistenzverhalten von R.lupini-Stämmen vor Erwerb des RP4-Faktors

I D 1.1.1 Resistenzverhalten gegenüber Ampicillin

Gegenüber Ampicillin zeigen R.lupini-Stämme eine natürliche Resistenz mit einer minimalen Hemmkonzentration (MHK) von 50-100 µg/ml (Tabelle II). Die Ursache dieser natürlichen Ampicillinresistenz wurde nicht aufgeklärt.

Tabelle II: MHK-Werte für R.lupini-Stämme vor und nach Erwerb des RP4-Faktors

Stämme	Minimale Hemmkonzentration in µg/ml		
	Ampicillin	Kanamycin	Tetracyclin
1-20	100	1	1,00
1-486	50	2	1,00
1-20 kan-r ^{a)}	50	800	0,25
1-20 (RP4)	800	128	64,00

a) chromosomale Kanamycinresistenz

I D 1.1.2 Resistenzverhalten gegenüber Kanamycin

R.lupini-Stämme erweisen sich als kanamycinsensitiv. Dies kann aus dem MHK-Wert von 1-2 µg/ml abgelesen werden (Tab. II). Plattiert man jedoch eine größere Anzahl von R.lupini-Zellen auf NB-Agar mit Kanamycinzusatz (40 µg/ml) aus, so kann man mit einer Rate von 10^{-7} kanamycinresistente Kolonien isolieren. Diese kanamycinresistenten Kolonien zeigen gegenüber Kanamycin eine Hemmkonzentration, die über 800 µg/ml liegt (Tabelle II). Mit Hilfe von Konjugationsexperimenten konnte nachgewiesen werden, daß diese spontane Kanamycinresistenz bei R.lupini chromosomal codiert vorliegt. Zu diesem Zweck wurde ein kan-r, auxotropher Donor mit einer Reihe von kan-s, auxotrophen Rezipienten gekreuzt. Selektiert wurde in diesen Kreuzungen nach prototrophen Rekombinanten, die anschließend auf Kanamycinresistenz getestet wurden. Es ergab sich, daß die kan-Markierung bevorzugt mit der his-Markierung aus der d-Region des R.lupini-Chromosoms (Heumann et al. 1973) rekombiniert wird (Tabelle III).

Tabelle III: Kartierung der chromosomalen Kanamycinresistenz bei R.lupini

kan-r Donor		kan-s Rezipient	auxotrophe Markierung des Rezipienten	1-Satz der kan-r prototrophen Rekombinanten
1-44	x	1-486	litv	25%
1-44	x	1-596	his	67%
1-44	x	1-723	pro	35%
1-44	x	1-793	thr	18%

I D 1.1.3 Resistenzverhalten gegenüber Tetracyclin

Auch gegenüber Tetracyclin erweisen sich R.lupini-Stämme als sensitiv. Als minimale Hemmkonzentration ergibt sich ein Wert von 1 µg/ml (Tabelle II). Eine spontane Tetracyclin-resistenz wurde nicht beobachtet.

I D 1.2 Resistenzverhalten von R.lupini-Stämmen nach RP4-Erwerb

Nach Erwerb des RP4-Faktors ändern sich die MHK-Werte von R.lupini-Stämmen gegenüber Ampicillin, Kanamycin und Tetracyclin beträchtlich (Tabelle II). Sie liegen jetzt für Ampicillin über 800 µg/ml, für Kanamycin bei 128 µg/ml und für Tetracyclin bei 64 µg/ml. Die durch den RP4-Faktor vermittelte Ampicillinresistenz kann der Abb. 1 entnommen werden. Sie kommt durch eine Penicillinase zustande, die von den Bakterienzellen ins Medium ausgeschieden wird. Zu bemerken bleibt, daß die RP4-codierte Kanamycinresistenz nicht so stark ausgeprägt ist wie die chromosomalcodierte Kanamycinresistenz.

I D 1.3 Folgerungen aus dem Resistenzverhalten von R.lupini-Stämmen vor und nach Erwerb des RP4-Faktors

Aus den MHK-Werten von R.lupini-Stämmen vor und nach Erwerb des RP4-Faktors können die Antibiotikakonzentrationen bestimmt werden, die zum sicheren Erkennen des RP4-Faktors in R.lupini-Zellen nötig sind. Für die Antibiotikazusätze

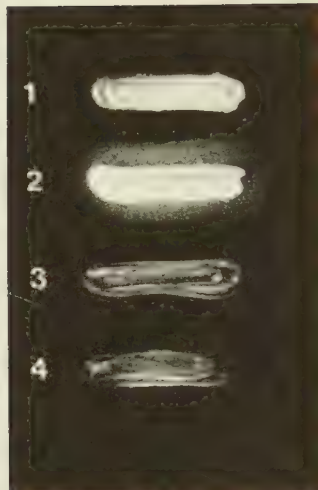


Abb. 1: Penicillinaseproduktion durch einen RP4-tragenden
E.coli- und R.lupini-Stamm

Die E.coli-Stämme K12 (1) und K12 (RP4) (2) und die R.lupini-
Stämme 1-2o (3) und 1-2o (RP4) (4) wurden mittels der jodo-
metrischen Methode von Perret (1954) auf Penicillinaseproduk-
tion getestet. Die sichtbaren Höfe der RP4-tragenden Strich-
kolonien zeigen die ins Medium ausgeschiedene Penicillinase an.

der Wachstumsmedien wurden folgende Konzentrationen ausgewählt:

Ampicillin	400 µg/ml
Kanamycin	40 µg/ml
Tetracyclin	30 µg/ml

RP4-haltige R.lupini-Stämme können auf diesen Medien wachsen, RP4-freie nicht. Zum Test auf RP4-Präsenz wurde zumeist ein Stempeltest auf Kanamycin-Agar durchgeführt. Wachstum auf beiden Medien ist ein sicheres Indiz für das Vorhandensein des RP4-Faktors in R.lupini.

I D 2 RP4-Transfer zwischen R.lupini-Stämmen

I D 2.1 Kreuzungsmethoden

Zum Transfer des RP4-Faktors werden beide Elternstämme gemeinsam auf eine nichtselektive NB-Platte ausgespatelt und über Nacht bei 30° C bebrütet. Das Kreuzungsgemisch wird anschließend abgeschwemmt und eine Verdünnungsreihe davon auf antibiotikahaltige Platten ausgespatelt.

Bei Verwendung eines str-s Donors und eines str-r Rezipienten kann zur Gegenselektion des Donors Streptomycin dienen. Eine typische Kreuzung für diese Methode ist:

1-20 (RP4): car-1, str-s x 1-486: car-y, str-r

R.lupini-Stämme bieten aufgrund ihrer Sternbildung (sta-Eigenschaft) noch eine weitere Möglichkeit zur Gegenselektion. Läßt man die Übernachtskultur eines sta⁺-Stammes im Reagenzglas stehen, so setzen sich die sta⁺-Zellen am Boden ab. Ein sta⁻-Stamm zeigt diese Eigenschaft nicht. Falls man bei einem RP4-Transfer nun das Kreuzungsgemisch eines sta⁺-Donors und eines sta⁻-Rezipienten in Flüssigkultur zieht, so kann man diese Bakteriensuspension durch einfaches "Stehenlassen" entmischen. Im Überstand befinden sich vornehmlich die sta⁻-Zellen des Rezipientenstammes. Da R.lupini-Stämme noch eine Farbmarkierung (car-Eigenschaft) tragen, kann man nach Ausplattieren des Überstandes in eindeutiger Weise den Rezipientenstamm erkennen. Ein Beispiel für diese Kreuzung ist:

1-486 (RP4): car-y, sta⁺ x 1-20: car-1, sta⁻

Mit den angegebenen Methoden wurden die in dieser Arbeit verwendeten RP4-tragenden R.lupini-Stämme konstruiert.

I D 2.2 Bedingungen für den RP4-Transfer: Abhängigkeit
von der Wuchsphase des Donor- und des Rezi-
pientenstammes

Den zeitlichen Ablauf des RP4-Transfers zwischen R.lupini-Stämmen kann man mit einer modifizierten "interrupted mating"-Technik verfolgen. Dazu sind folgende Schritte nötig:

- 1) Donor und Rezipient werden zum Zeitpunkt $t = 0$ auf eine Reihe von NB-Platten gespatelt und diese Platten bei 30°C inkubiert.
- 2) Zu unterschiedlichen Zeiten wird das Kreuzungsgemisch jeweils von einer Platte geerntet und die Kreuzungspare durch starkes Schütteln getrennt.
- 3) Durch Ausplattieren auf selektive Medien erhält man die Anzahl der RP4-tragenden Rezipientenzellen. Trägt man diese Zahl gegen die Kreuzungszeit auf, so bekommt man die gesuchte "interrupted mating"-Kurve.

Man kann dieses Experiment mit Elternkulturen aus unterschiedlichen Wuchsphasen durchführen und erhält dann die Abhängigkeit des RP4-Transfers vom physiologischen Zustand des Donor- und Rezipientenstammes. Zur Durchführung dieses Experimentes wurden der Donorstamm 1-20 (RP4): car-l, str-s, der Rezipientenstamm 1-486: car-y, str-r und die selektiven Medien NB + Kan + Str und NB + Tet + Str ausgewählt.

In Tabelle IV ist das Wuchsverhalten der Elternstämme dargestellt, die in den folgenden vier Kreuzungen Verwendung fanden:

Kreuzung A:	Donor stationär	x	Rezipient stationär
"	B: Donor stationär	x	Rezipient logarithmisch
"	C: Donor logarithmisch	x	Rezipient stationär
"	D: Donor logarithmisch	x	Rezipient logarithmisch

Die "interrupted mating"-Kurven für diese vier Kreuzungen sind in Abb. 2 wiedergegeben. Man erkennt, daß die Kurven für die Übertragung der Kanamycin- und Tetracyclinresistenz einen analogen Verlauf nehmen. Unterschiede findet man jedoch in Abhängigkeit von der Wuchsphase des Donors. Die "interrupted mating"-Kurven für den stationären Donor sind gegenüber dem logarithmischen Donor um rund 60 min verschoben. Man kann daraus ableiten, daß eine R.lupini-Zelle den RP4-Faktor bevorzugt in der logarithmischen Phase transferiert. Der physiologische Zustand des Rezipienten scheint dagegen für den RP4-Transfer keine größere Rolle zu spielen. Der Verlauf der "interrupted mating"-Kurven für die Kreuzungen C und D entspricht dem Ergebnis von Olsen und Shipley (1973), die mit dem R-Faktor R1822 in P.aeruginosa ein ähnliches "interrupted mating"-Experiment, allerdings in Flüssigmedium, durchgeführt haben.

Tabelle IV: Wuchsverhalten der logarithmischen und stationären R.lupini-Stämme 1-486 und 1-20 (RP4)

Zeit in Std	o.D. von 1-20 (RP4)		o.D. von 1-486	
	log	stat	log	stat
0	0,3	0,98	0,28	0,97
3,5 ^{a)}	0,53	1,1	0,53	1,1
7	0,97	1,1	0,88	1,15

a) Zu diesem Zeitpunkt wurden Donor- und Rezipientenkulturen für das Experiment der Abb.2 entnommen.

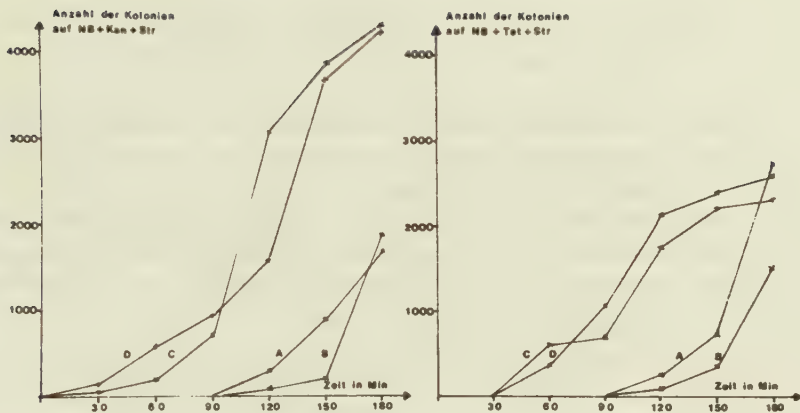


Abb. 2: Abhängigkeit des RP4-Transfers in R.lupini vom physiologischen Zustand des Donor- und Rezipientenstammes

Mit Hilfe einer modifizierten "interrupted mating"-Technik wurde der zeitliche Ablauf des RP4-Transfers in R.lupini in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand des Donor- und Rezipientenstammes gemessen. Aufgetragen sind die "interrupted mating"-Kurven der resistenten Kolonien auf Kanamycin- und Tetracyclin-Agar für die Kreuzungen 1-20: car-1, hisC, str-s (RP4) x 1-486: car-y, ilv, str-r, wobei die Elternstämme bei Kreuzungsbeginn entweder der stationären oder logarithmischen Wachstumsphase entnommen wurden (Tabelle IV).

Kreuzung A:	Donor stationär	x	Rezipient stationär
" B:	" stationär	x	" logarithmisch
" C:	" logarithmisch	x	" stationär
" D:	" logarithmisch	x	" logarithmisch

selektive Medien: NB + Tet + Str
 NB + Kan + Str

I D 3 Inhibierung der Rhizobium lupini-Fertilität durch den RP4-Faktor

Resistenzfaktoren werden, je nachdem ob sie die Fertilität von E.coli inhibieren oder nicht, in die Klassen fi^+ bzw. fi^- eingeteilt. Der RP4-Faktor gehört zur Klasse der fi^- -Resistenzfaktoren (Datta et al., 1971). In diesem Abschnitt soll nun gezeigt werden, daß der RP4-Faktor auf das Konjugationssystem von R.lupini einwirkt und die Donorfähigkeit von R.lupini-Zellen ausschaltet.

I D 3.1 Qualitativer Nachweis der Fertilitätsinhibierung durch den RP4-Faktor

Die Donorfähigkeit von R.lupini-Stämmen läßt sich durch einen einfachen Stempeltest nachweisen. Dazu geht man von Einzel- oder Strichkolonien eines Donorstammes aus und stempelt diese auf einen Rezipientenrasen, der sich auf Minimalmedium (MM + NB) befindet. Sind die beiden Elternstämme auxotroph, so können sie auf diesem Medium nicht wachsen. Nach chromosomalem Gentransfer und Ausbildung prototropher Rekombinanten, können diese aber zu Kolonien auswachsen. Wachstum im Rezipientenrasen markiert also die Stelle auf der Stempelplatte, an der chromosomaler Gentransfer stattgefunden hat. Ein Beispiel für diese Technik ist in Abb. 3 gegeben. Getestet wurden 6 unabhängig voneinander isolierte Kolonien des R.lupini-Stammes 1-20: hisC, car-1, die auf den Rezipientenrasen 1-486: ilv, car-y gestempelt wurden. Genau an der Stelle des Stempelabdrucks der Strichkolonien bildet der Rezipientenrasen dicht liegende Einzelkolonien aus, die auf Grund ihrer Farbe identifiziert werden können.

Oberträgt man nun den RP4-Faktor auf den R.lupini-Donorstamm 1-20 und wiederholt diesen Test mit unabhängig isolierten Kolonien, so findet man (Abb. 4), daß die RP4-tragenden R.lupini-Kolonien des Stamms 1-20 ihre Fertilität verloren

haben. Im Bereich des Stempelabdrucks der Strichkolonien wachsen auf dem Rezipientenrasen dieses Mal keine prototrophen Kolonien. Neben diesem Fertilitätstest (Platte d) zeigen die anderen Stempelplatten der Abb. 4 den Test auf Kanamycinresistenz (Platte a), auf Tetracyclinresistenz (Platte b) und auf RP4-Transfer (Platte c). Mit diesen zusätzlichen Stempelerperimenten ist der funktionsfähige RP4-Faktor in dem R.lupini-Stamm 1-20 nachgewiesen.

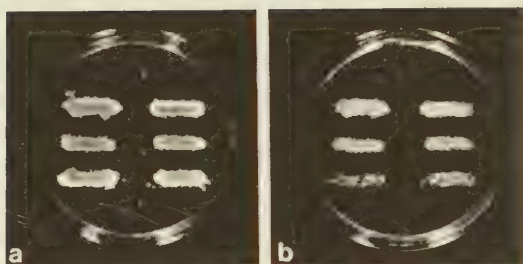


Abb. 3: Fertilitätstest von Strichkolonien des R.lupini-
Stammes 1-2o

Auf der Ausgangsplatte (a) wurden 6 unabhängig voneinander isolierte Kolonien des Stammes 1-2o mit der Öse ausgestrichen. Nach Anwachsen der Strichkolonien wurden diese mit Hilfe der Stempeltechnik auf chromosomalen Gentransfer getestet (b). Als Rezipientenrasen diente 1-486 auf Minimalagar (MM + NB).

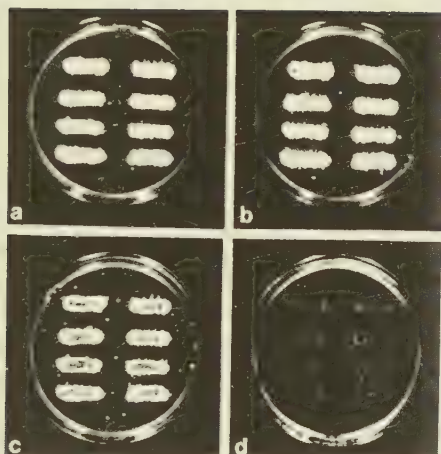


Abb. 4: Fertilitätstest von RP4-tragenden R.lupini-Strichkolonien des Stammes 1-2o

8 unabhängig voneinander isolierte RP4-tragende Kolonien des Stammes 1-2o wurden mit Hilfe der Stempeltechnik auf Kanamycinresistenz (a), auf Tetracyclinresistenz (b), auf RP4-Transfer (c) und auf Fertilität (d) getestet. Als Rezipientenrasen für den RP4-Transfer diente 1-25o, während für den Fertilitätstest 1-486 verwendet wurde.

I D 3.2 Quantitativer Nachweis der Fertilitäts- inhibierung durch den RP4-Faktor

Zum quantitativen Nachweis der Fertilitätsinhibierung von R.lupini wurden die Kreuzungen A und B ausgewählt:

A: 1-20:Fc⁻Fd⁺, hisC, car-1 x 1-486:Fc⁻Fd⁻, ilv, car-y

B: 1-624:Fc⁺Fd⁺, ilv, car-y x 1-596:Fc⁻Fd⁻, hisC,car-p

Diese Kreuzungen zeichnen sich durch folgende Eigenschaften aus: Die Donorstämme 1-20 und 1-624 übertragen jeweils die d-Region des R.lupini-Chromosoms (Heumann et al., 1973). hisC und ilv, die beiden auxotrophen Markierungen dieser Stämme, liegen in dieser d-Region. Die Farbmarkierung car der c-Region wird damit von dem Rekombinationsgeschehen nicht betroffen. Die Stämme wurden so ausgewählt, daß die beiden Kreuzungspartner stets unterschiedliche Farbmarkierungen tragen. Zur Durchführung dieser Kreuzung ist zu bemerken, daß O-Kulturen der beiden Elternstämmen in den Mischstufen 0, 10⁻¹, 10⁻² und 10⁻³ Verwendung fanden. Diese Mischstufen entstanden wie folgt: Der Rezipientenstamm in der Verdünnungsstufe 0 wurde im Verhältnis 1 : 1 mit dem Donorstamm in der Verdünnungsstufe 0, 10⁻¹, 10⁻² und 10⁻³ gemischt. Von diesen Mischstufen wurden jeweils 0,1 ml auf MM + NB Platten ausgespatelt. Zur Kontrolle wurden die Elternstämmen aus der Verdünnungsstufe 0 auf die Kreuzungsplatten gespatelt.

Die Kreuzungen A und B erfolgten einmal (A1 und B1) mit einem RP4-freien Donorstamm und parallel dazu (A2 und B2) mit dem entsprechenden RP4-tragenden Donorstamm. Die Ergebnisse sind der Tabelle V zu entnehmen. Bei Verwendung der RP4-tragenden Donorstämme zeigen die selektiven Platten der Kreuzungen A2 und B2 sehr wenige Kolonien, deren Anzahl nur knapp über der Rückmutationsrate der Elternstämmen liegt. Die Kreuzungen mit den RP4-freien Donorstämmen dagegen produzieren eine große Anzahl von Rekombinantenzolonien, die die Rückmutationsrate bis

zu einem Faktor von 10^3 übertreffen. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Anwesenheit des RP4-Faktors in der Donorzelle deren Fertilität nahezu vollkommen ausschaltet.

Andererseits behindert ein RP4-Faktor in der Rezipientenzelle den chromosomalen Gentransfer und das Rekombinationsgeschehen nicht. Dies konnte mit der Kreuzung A3 nachgewiesen werden. In dieser Kreuzung wurde ein RP4-tragender Rezipientenstamm verwendet. Die Rekombinanzzahlen unterscheiden sich kaum von der Vergleichskreuzung A1, in welcher der analoge, aber RP4-freie Rezipientenstamm Verwendung fand.

Tabelle V: Einfluß des RP4-Faktors auf den chromosomalen Gentransfer von Rhizobium lupini

Kreuzung	Donor		Rezipient	Anzahl der Rekombinantenkolonien pro Platte			
				Stufe 0	Stufe -1	Stufe -2	Stufe -3
A1	1-2o	x	1-486	y: n.a.	y: 179o	y: 357	y: 6o
A2	1-2o (RP4)	x	1-486	y: 3	y: 9	y: 5	y: 6
A3	1-2o	x	1-486 (RP4)	y: n.a.	y: 1644	y: 231	y: 33
B1	1-624	x	1-596	p: n.a.	p: 3o3	p: 37	p: 2
B2	1-624 (RP4)	x	1-596	p: 9	p: 7	p: 2	p: o

Kontrollen: Von den Elternkulturen wurden jeweils 0,1 ml auf Minimalagar (MM + NB) ausgespatelt. Die maximale Kolonienzahl pro Platte betrug 3.

Zeichenerklärungen: n.a.: "nicht auswertbar" auf Grund zu vieler Rekombinanten
y: yellow (gelb), p: pink (rosa)

I D 3.3 Rückgewinnung der Fertilität nach RP4-Verlust

Bisher wurde gezeigt, daß durch Anwesenheit des RP4-Faktors in einer R.lupini-Donorzelle deren Fertilität ausgeschaltet wird. Interessant ist nun die Frage nach dem Ausschaltungsmechanismus. Man könnte sich vorstellen, daß es sich um einen irreversiblen Prozeß handelt, d. h., daß die genetische Information der Donorfähigkeit in der R.lupini-Zelle bei RP4-Erwerb irreversibel verlorenggeht. Andererseits könnte es sich aber auch um einen reversiblen Inhibierungsprozeß handeln. Zwischen diesen beiden Prozessen kann sehr einfach unterschieden werden, denn nach Verlust des RP4-Faktors müßte beim Inhibierungsprozeß die Fertilität der R.lupini-Zelle rekonstituiert werden. Da der RP4-Faktor in der R.lupini-Zelle instabil vorliegt und leicht verlorenggeht, sind solche Experimente möglich. Testet man ehemalige Donorstämme nach Verlust des RP4-Faktors auf Fertilität, so findet man bei den meisten eine Rekonstitution der Donoreigenschaft. Dieses Ergebnis wurde bei folgenden Stämmen erzielt:

1-491 : Fc^+Fd^+ , thi, car-1
1-489 : Fc^+Fd^+ , thi, car-y
1-480 : Fc^+Fd^+ , cys, car-y
1-482 : Fc^-Fd^+ , cys, car-1
1-488 : Fc^-Fd^+ , ilv, car-1

Als besonders interessant erwiesen sich die angeführten Experimente mit dem Stamm 1-491, deren Ergebnisse in Teil II dieser Arbeit dargestellt werden. Dort wird gezeigt, daß auf dem RP4-Faktor ein Gen für die Fertilitätsinhibierung existiert, das gleichzeitig auch für den Konjugations-transfer des RP4-Faktors benötigt wird.

Eine Ausnahme in der obigen Versuchsreihe ergab sich bei dem Stamm 1-20. Die Mehrzahl der 1-20 Kolonien zeigte nach RP4-Verlust kein erneutes Auftreten der Donorfunktion. Es wird vermutet, daß es sich hierbei um eine echte Um-

wandlung von einem Donorstamm in einen Rezipientenstamm handelt. Inwieweit der RP4-Faktor hierbei eine Rolle spielt, konnte nicht geklärt werden. Insgesamt ist jedoch gezeigt, daß der RP4-Faktor die Fertilität von R.lupini reversibel inhibiert, da diese nach RP4-Verlust in fast allen Fällen wieder zurückgewonnen wird.

R.lupini-Stämme erweisen sich als isosexuell (Heumann et al., 1971). Durch Mutagenese kann die Donoreigenschaft zerstört werden. Diese Mutanten fungieren in Kreuzungen als Rezipienten. Kreuzungen zwischen solchen Rezipientenstämmen sind infertil. Trägt ein Rezipientenstamm allerdings einen frisch übertragenen RP4-Faktor, so kann er hierdurch seine Donorfähigkeit für chromosomale Gene wiedererlangen (Abb. 5). In einer Schnellkreuzung wurde der Rezipientenstamm 1-596: Fc^-Fd^- , hisC, car-p gegen zwei unabhängig voneinander isolierte, RP4-tragende Rezipientenstämmen 1-486: Fc^-Fd^- , ilv, car-y auf Minimalagar (MM + NB) quergestrichen. Überraschenderweise entwickelten sich im Kreuzungsbereich prototrophe Kolonien vom Farbtyp car-p. Man kann dieses Ergebnis so deuten, daß der RP4-Faktor in 1-486 die hisC⁺-Markierung der d-Region des R.lupini-Chromosoms nach 1-596 übertragen hat. Von dieser Annahme ausgehend wurde auf einer breiteren Basis die Initiierung des chromosomalen Gentransfers in R.lupini durch den RP4-Faktor geprüft. In insgesamt zwei Fällen konnte die Übertragung von chromosomalen Genen demonstriert werden. Neben der hisC-Markierung der d-Region wurde noch die ade-Markierung der c-Region durch den RP4-Faktor transferiert. Dieses Ergebnis kann dem Zahlenmaterial der Tabelle VI entnommen werden. Hier wurden in Kreuzungen mit den Stämmen 1-596: Fc^-Fd^- , hisC, car-p und 1-595: Fc^-Fd^- , ade, car-y die Partnerstämmen 1-486, 1-486 (RP4, tra⁻) und 1-486 (RP4) verwandt. Der Stamm 1-486: Fc^-Fd^- , ilv, car-y trug in diesen Kreuzungen also

- entweder einen intakten RP4-Faktor,
- oder einen transferdefekten RP4-Faktor (RP4⁻tra⁻, siehe auch Abschnitt I D 6),
- oder keinen Resistenzfaktor.

Nur bei Anwesenheit des intakten Resistenzfaktors RP4 in dem Stamm 1-486 entwickelten sich prototrophe Rekombinantenkolonien. Man kann die Entstehung dieser Rekombinantenkolonien dem Transfersystem des RP4-Faktors zuschreiben, da ein transferdefekter RP4-Faktor diesen Effekt nicht hervorruft. Aus diesen Ergebnissen kann man einen RP4-initiierten, chromosomalen Gentransfer in R.lupini folgern. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, daß dieser Gentransfer um den Faktor 10^{-3} bis 10^{-4} schlechter funktioniert als mit dem R.lupini-eigenen Konjugationssystem.

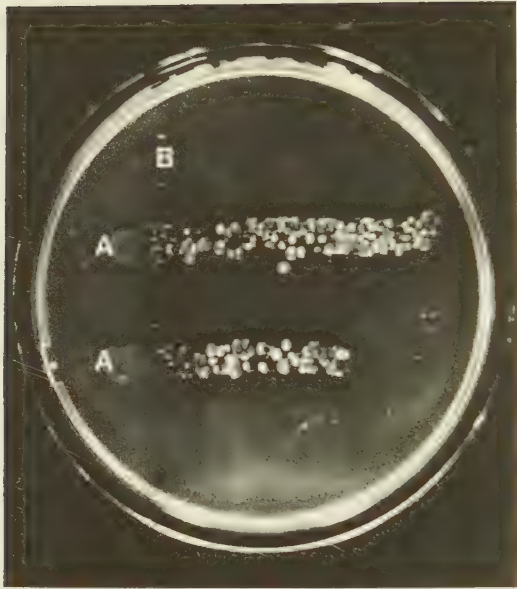


Abb. 5: RP4-initiiertes, chromosomales Gentransfer
zwischen R.lupini-Stämmen

Die folgenden Rezipientenstämme wurden in einer Schnellkreuzung auf Minimalagar (MM + NB) gegeneinander ausgestrichen:

1-486 (RP4): *ilv*, *car-y* (A)
1-596 : *hisC*, *car-p* (B)

Im Kreuzungsbereich entwickeln sich Rekombinanten, die fast alle die Farbe des Stammes 1-596 tragen.

Tabelle VI: RP4-initiiertes, chromosomales Gentransfer
zwischen R. lupini-Stämmen

Kreuzung			Anzahl der Rekombinan- ten pro Platte
1-486 (RP4)	x	1-596	p: 80
1-486 (RP4,tra ⁻)	x	1-596	p: 0
1-486	x	1-596	p: 7 ^{a)}
1-486 (RP4)	x	1-595	y: 188
1-486 (RP4,tra ⁻)	x	1-595	y: 1
1-486	x	1-595	y: 17 ^{a)}

Kontrollen		Anzahl der Rückmutanten pro Platte
1-486 (RP4)		7
1-486 (RP4,tra ⁻)		3
1-486		12
1-595		0
1-596		0

^{a)} entspricht der Rückmutationsrate von 1-486

Stämme und R-Faktoren:

1-486	:	ilv, car-y
1-596	:	hisC, car-p
1-595	:	ade, car-y
RP4,tra ⁻	:	transferdefekter RP4-Faktor

Der RP4-Faktor zeigt in R.lupini-Zellen ein instabiles Verhalten, d. h., ein RP4-tragender Stamm segregiert beständig Zellen, die den RP4-Faktor verloren haben. Dies kann man anhand eines RP4-tragenden Stammes testen, der über längere Zeit auf antibiotikafreiem Medium kultiviert wurde. Legt man von einem solchen Stamm Einzelkolonien an und überstempelt diese auf antibiotikahaltige Platten, so kann man den Prozentsatz des RP4-Verlustes bestimmen. Im Experiment der Abb. 6 wurde dazu der Stamm 1-624 benutzt. Er zeigte einen RP4-Verlust von 56%.

Zur quantitativen Bestimmung des RP4-Verlustes wurde der Stamm 1-486 (RP4) benutzt. Er wurde über längere Zeit im Schüttelwasserbad bei 30° C in NB-Bouillon kultiviert und sein Lebendtitel wurde zwei Mal pro Tag durch Ausplattieren auf NB-Agar gemessen. Überstempelt man die dabei entstehenden Einzelkolonien auf NB + Kan- und NB + Tet-Platten, so erhält man gleichzeitig den Prozentsatz der RP4-tragenden Kolonien. In Abb. 7 ist das Ergebnis dargestellt. Man findet, daß die Überlebensfähigkeit von 1-486 im stationären Wachstum logarithmisch abnimmt. Innerhalb von 65 Stunden sinkt der Lebendtitel von 5×10^9 auf 10^5 (Abb. 7). Außerdem beobachtet man in dieser stationären Phase einen starken RP4-Verlust. Der Prozentsatz RP4-tragender, lebensfähiger Zellen geht von rund 90% innerhalb von 65 Stunden auf 20% zurück (Abb. 7).

Diese Versuche weisen auf eine partielle Restriktion des RP4-Faktors in der R.lupini-Zelle hin. Führt man diese Versuche parallel mit dem RP4-Faktor in der E.coli-Zelle durch, so findet man dort ein vollkommen stabiles Verhalten. Die Instabilität von RP4 in R.lupini ist also keine generelle Eigenschaft des RP4-Faktors.

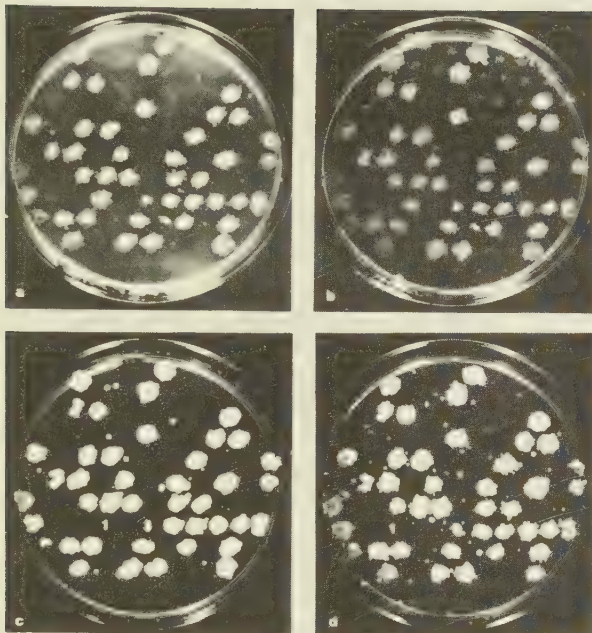


Abb. 6: Instabilität des RP4-Faktors in R.lupini

Der Stamm 1-624 wurde für längere Zeit auf antibiotikafreiem Medium kultiviert. Einzelkolonien dieses Stammes wurden mittels Stempeltests auf

- a) Kanamycinresistenz,
 - b) Tetracyclinresistenz,
 - c) Transfer der kan-r Markierung (Rezipientenrasen 1-2o rev) und
 - d) Transfer der tet-r Markierung (Rezipientenrasen 1-2o rev)
- geprüft. 56% der Kolonien haben den RP4-Faktor verloren. Die mit (1) gekennzeichnete Kolonie erweist sich außerdem als transferdefekt (siehe Teil I D 6).

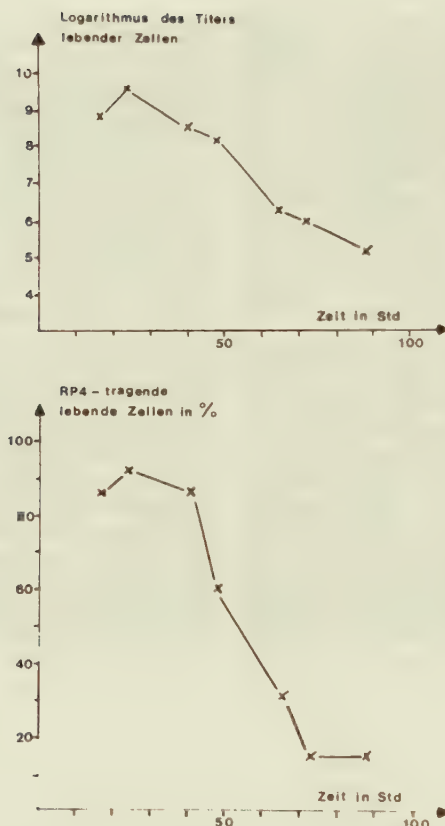


Abb. 7: Überlebensfähigkeit und RP4-Verlust von R.lupini-Zellen in der Stationärphase

RP4-tragende R.lupini-Zellen vom Stamm 1-486 wurden für längere Zeit (4 Tage) im Wasserbad gewachsen. Der Verlauf ihres Lebendtiters ist im oberen Diagramm dargestellt. Er wurde durch Ausplattierung einer Verdünnungsreihe auf NB-Agar bestimmt. Stempelt man die dabei entstehenden Einzelkolonien auf Kanamycin- und Tetracyclin-Agar, so bekommt man den Prozentsatz RP4-tragender Kolonien (unteres Diagramm)

I D 6 Tranferdefekte RP4-Faktoren in Rhizobium lupini

I D 6.1 Nachweis transferdefekter RP4-Faktoren

Zur Isolierung transferdefekter RP4-Faktoren benötigt man in R.lupini kein spezielles Selektionsverfahren, da sie spontan mit einer Rate im Prozentbereich auftreten. Dies kann mit folgendem Versuch demonstriert werden.

Der RP4-tragende R.lupini-Stamm 1-486 wurde für längere Zeit (4 Tage) in Flüssigmedium (NB) angezogen. Um ihn in der log-Phase zu halten, wurde er einmal pro Tag mit niedrigem Titer in frisches Medium überimpft. Von dieser Kultur wurden anschließend Einzelkolonien auf Tetracyclin-Agar (NB + Tet) durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe angelegt. Diese tetracyclinresistenten Kolonien wurden dann mittels steriler Zahnstocher in regelmäßiger Anordnung auf eine NB-Platte übertragen. Nach Anwachsen der Kolonien wurden diese mit Hilfe der Stempeltechnik auf Kanamycin- und Tetracyclinresistenz, sowie auf Transfer dieser Resistenzgene getestet. Abb. 8 zeigt das Ergebnis. Alle 100 getesteten Kolonien sind sowohl kanamycin- als auch tetracyclinresistent.

Zum Nachweis der RP4-Transmissionsfähigkeit dieser Kolonien wurde ein Stempelverfahren entwickelt, das sich an die Methode zum Nachweis des chromosomalen Gentransfers anlehnt. Die auxotrophen RP4-tragenden Kolonien werden auf einen prototrophen Rezipientenrasen gestempelt, der sich auf Minimalagar mit Antibiotikazusatz befindet. Der RP4-tragende Stamm kann aufgrund seiner Auxotrophie, der Rezipientenrasen wegen der fehlenden Antibiotikaresistenz auf diesem Minimalmedium mit Antibiotikazusatz nicht wachsen. Wird der RP4-Faktor aber nun auf die Zellen des Rezipientenrasens übertragen, so können diese Zellen Kolonien ausbilden. Wachstum des Rezipientenrasens zeigt also den erfolgten RP4-Transfer an (Burkardt, 1972; Pühler et al., 1974).

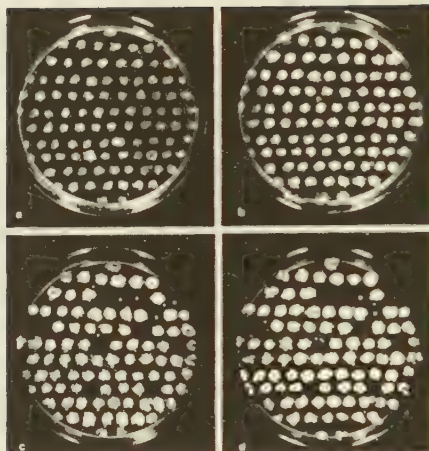


Abb. 8: Nachweis von transferdefekten RP4-Faktoren in
R.lupini

Der RP4-tragende R.lupini-Stamm 1-48b wurde für längere Zeit (4 Tage) in Flüssigmedium gewachsen. 100 tetracyclinresistente Kolonien dieses Stammes wurden anschließend mittels Stempeltechnik auf Kanamycinresistenz (a) und Tetracyclinresistenz (b) geprüft. In (c) und (d) wurde die Transmissionsfähigkeit der kan-r bzw. der tet-r Markierung der ausgewählten Kolonien untersucht. Als Rezipientenrasen diente der Stamm 1-2o rev. Das fehlende Kolonienwachstum auf den Platten der Abb. c und d zeigt fehlenden RP4-Transfer an. Die entsprechenden Ausgangskolonien tragen also transferdefekte RP4-Faktoren.

Im Versuch der Abb. 8 diente als Rezipientenrasen der Stamm 1-20 rev: prt, car-1. Sowohl auf MM + NB + Kan als auch auf MM + NB + Tet zeigt dieser Rasen nach Überstempeln der RP4-tragenden Kolonien von 1-486: ilv, car-y das gleiche Wuchsmuster. Die Farbmarkierung car-1 (weiß) erleichtert die Identifizierung des Rezipientenrasens. Anhand des Wuchsmusters erkennt man auf den beiden Antibiotikamedien, daß ein Großteil der Kolonien von 1-486 (RP4) sowohl Kanamycin- als auch die Tetracyclinresistenz transferierten, daß aber auch 10% der Kolonien zu keinem RP4-Transfer mehr fähig waren. Diesen letztgenannten Kolonien wurde ein transferdefekter RP4-Faktor zugeordnet, der die Bezeichnung RP4-tra⁻ (Abkürzung von transferdefekt) erhielt.

I D 6.2 Übertragungstest transferdefekter RP4-Faktoren von Rhizobium lupini nach Escherichia coli

Mit Hilfe der oben ausgeführten Stempelmethode, die es gestattet, den RP4-Transfer von Einzelkolonien zu testen, konnte der Nachweis transferdefekter RP4-Faktoren geführt werden. In diesem Abschnitt soll nun das Transferverhalten von RP4-Faktoren, besonders von transferdefekten RP4-Faktoren, zwischen dem Bodenbakterium R.lupini und dem Enterobakterium E.coli untersucht werden.

I D 6.2.1 Transferdefekte RP4-Faktoren mit Resttransfer

Transferdefekte RP4-Faktoren in R.lupini 1-486 zeigen einen geringen Resttransfer nach E.coli. Dieses Ergebnis konnte aus Kreuzungen mit E.coli K 12 gewonnen werden, in denen die folgenden Donoren Verwendung fanden:

- 1-486 (RP4): zwei normale RP4-tragende 1-486 Stämme
- 1-486 (RP4-tra⁻): zwei 1-486 Stämme mit transferdefekten RP4-Faktoren

- 1-486: zwei 1-486 Stämme, die den RP4-Faktor spontan verloren hatten

Diese R.lupini-Stämme wurden jeweils in gleichen Mengen mit E.coli K12 gemischt. Von dieser Mischung wurde 0,1 ml auf NB-Platten ausgespatelt. In Tabelle VII sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Verwendet man den Donorstamm 1-486 (RP4), so findet man auf allen Antibiotikamedien resistente E.coli-Kolonien, während in der Kreuzung mit dem Stamm 1-486 (RP4-tra⁻) nur auf Ampicillin-Agar einige resistente Kolonien mit einer um den Faktor 10^{-4} reduzierten Rate entstehen. Die Kreuzung mit dem RP4-freien Stamm 1-486 liefert erwartungsgemäß keine ampicillin-, kanamycin- und tetracyclin-resistenten Kolonien.

Testet man die entstandenen resistenten Kolonien auf die jeweils nichtselektierten Resistenzmarker, so findet man, daß diese in allen Fällen vollständig vorhanden sind. Daraus folgt, daß auch der transferdefekte RP4-Faktor vollständig nach E.coli übertragen wurde. Allerdings darf man nicht außer acht lassen, daß die Transferrate um den Faktor 10^{-4} verringert war und daß nur auf Ampicillin-Agar RP4-tragende Kolonien entstanden.

Diese RP4-tragenden E.coli Kolonien wurden noch auf PRR1-Sensitivität getestet. Dabei ergab sich, daß der RP-spezifische RNS-Phage PRR1 alle die in diesem Versuch entstandenen RP4-tragenden E.coli-Stämme lysieren konnte.

I D 6.2.2 Transferdefekte RP4-Faktoren ohne Resttransfer

Eine Wiederholung der Experimente aus Punkt 6.2.1 mit transferdefekten RP4-Faktoren in 1-20 und 1-624 ergab keinerlei RP4-Transfer nach E.coli (Tabelle VIII). Als Kontrolle wurden wiederum Kreuzungen mit normalen RP4-tragenden R.lupini-Stämmen 1-20 und 1-624 durchgeführt. Diese Kontrollen erbrachten jeweils hohe Transferraten. Die in diesen Versuchen

verwandten transferdefekten RP4-Faktoren erwiesen sich also als vollständig transfer-negativ.

Tabelle VII: RP4-Transfer zwischen dem Bodenbakterium Rhizobium lupini und dem Enterobakterium Escherichia coli

Kreuzung				Anzahl der resistenten <u>E.coli</u> -Zellen pro ml selektioniert auf den Medien		
				MM + Amp	MM + Kan	MM + Tet
1-486 (RP4) ^{a)}	x	K12		$4,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$
1-486 (RP4) ^{a)}	x	K12		$3,7 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$
1-486 (RP4,tra ⁻) ^{b)}	x	K12		$3,4 \times 10^3$	o	o
1-486 (RP4,tra ⁻) ^{b)}	x	K12		$1,8 \times 10^3$	o	o
1-486 c)	x	K12		o	o	o
1-486 c)	x	K12		o	o	o

- Verwendung fanden: ^{a)} unabhängig voneinander isolierte RP4-tragende 1-486 Kolonien
^{b)} unabhängig voneinander isolierte 1-486 Kolonien mit transferdefekten RP4-Faktoren
^{c)} unabhängig voneinander isolierte 1-486 Kolonien, die den RP4-Faktor spontan verloren haben

Tabelle VIII: RP4-Transfer zwischen dem Bodenbakterium Rhizobium lupini und dem Enterobakterium Escherichia coli

Kreuzung				Anzahl der resistenten <u>E.coli</u> -Zellen pro ml selektioniert auf den Medien:		
				MM + Amp	MM + Kan	MM + Tet
1-2o (RP4) ^{a)}	x	K12		$9,7 \times 10^7$	$9,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$
1-2o (RP4) ^{a)}	x	K12		$6,5 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$	$7,1 \times 10^7$
1-2o (RP4,tra ⁻) ^{b)}	x	K12		o	o	o
1-2o (RP4,tra ⁻) ^{b)}	x	K12		o	o	o
1-624 (RP4)	x	K12		$1,8 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
1-624 (RP4,tra ⁻)	x	K12		o	o	o

- Verwendung fanden: ^{a)} unabhängig voneinander isolierte RP4-tragende 1-2o Kolonien
^{b)} unabhängig voneinander isolierte 1-2o Kolonien mit transferdefekten RP4-Faktoren

Wächst man RP4-tragende R.lupini-Zellen für längere Zeit im antibiotikafreien Medium und analysiert anschließend diese Zellen, so findet man -wie gezeigt- neben RP4-Verlust auch transferdefekte RP4-Faktoren. Da ein R-Faktor aus Resistenztransfereinheit und r-Determinante besteht, ergibt sich die Frage, ob man in R.lupini auch RP4-Faktoren mit veränderter oder verkürzter r-Determinante isolieren kann. Solche RP4-Mutanten können in R.lupini gefunden werden.

I D 7.1 Nachweis von ampicillin- oder kanamycinsensitiven, RP4-tragenden R.lupini-Stämmen

Testet man Einzelkolonien eines RP4-tragenden R.lupini-Stammes auf die Antibiotikaresistenz des RP4-Faktors, so findet man immer wieder Kolonien, die entweder die Kanamycin- oder die Ampicillinresistenz verloren haben (Abb. 9). Solche Kolonien treten mit einer Rate von rund 1% auf. Sie sind im Stempeltest also ohne größere Schwierigkeiten nachzuweisen. Für den Verlust der Ampicillin- oder Kanamycinresistenz kann man annehmen, daß der RP4-Faktor um das entsprechende Resistenzgen verkürzt wurde. Diese Annahme läßt sich durch einen Transfer des in Frage kommenden RP4-Faktors nachprüfen. Die verkürzte Resistenzdeterminante mußte bei einem solchen Transfer erhalten bleiben. Abbildung 9 bestätigt diese Annahme. Eine kan-s RP4-Mutante kann im RP4-Transfertest nur die Tetracyclinresistenz auf den Rezipientenrasen übertragen. Im nächsten Abschnitt wird der Transfer von solchen RP4-Mutanten nach E.coli beschrieben.

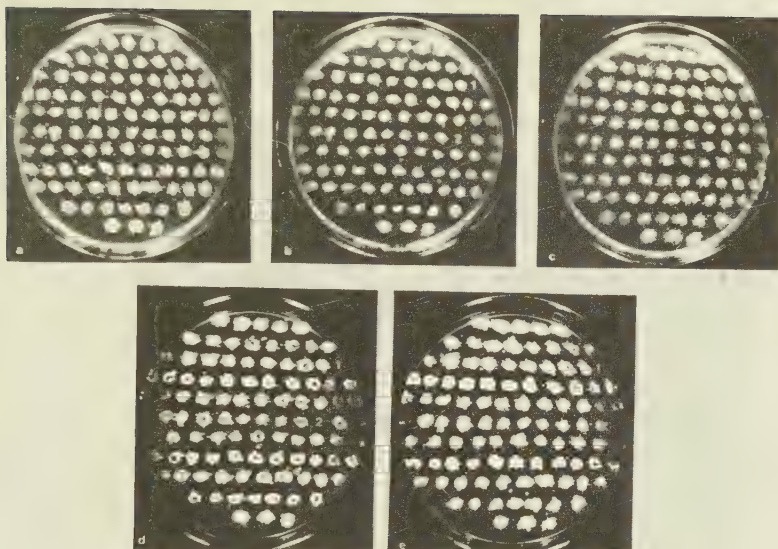


Abb. 9: Der Nachweis von kanamycinsensitiven RP4-Faktoren

1-624 Kolonien, die sich auf Grund des RP4-Faktors als tetracyclin-resistent erwiesen, wurden folgenden Stempeltests unterworfen:

- a) Test auf Ampicillinresistenz
- b) Test auf Kanamycinresistenz
- c) Test auf Tetracyclinresistenz
- d) Test auf Transfer der kan-r Markierung
Rezipientenrasen: 1-20 rev
- e) Test auf Transfer der tet-r Markierung
Rezipientenrasen: 1-20 rev

Die mit 1 gekennzeichnete Kolonie besitzt einen kanamycin-sensitiven, transferdefekten RP4-Faktor; Kolonie Nummer 2 dagegen einen kanamycin-sensitiven, aber transferfähigen RP4-Faktor.

I D 7.2 Transfer von RP4-Mutanten mit verkürzter
r-Determinante von Rhizobium lupini nach
Escherichia coli

Die im vorhergehenden Abschnitt dargestellten RP4-Mutanten zeichnen sich durch eine Ampicillin- oder durch eine Kanamycinsensitivität aus. Für diese Mutanten wurde folgende Nomenklatur gewählt:

RP4 : amp-r, kan-r, tet-r
RP4-2 : amp-s, kan-r, tet-r
RP4-3 : amp-r, kan-s, tet-r

Die angeführten Resistenzspektren von RP4, RP4-2 und RP4-3 werden nochmal in Abb. 10 dargestellt. Diese RP4-Mutanten werden nun nach E.coli transferiert. Als Kreuzungsmethode wurde das in Abschnitt I D 6.2.1 beschriebene Verfahren angewandt. In Tabelle IX sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Man sieht, daß beim Transfer von RP4-2 keine ampicillin-resistenten und beim Transfer von RP4-3 keine kanamycin-resistenten E.coli-Kolonien entstehen. Ein Nachtesten der Resistenzmarker von RP4-2 und RP4-3 in E.coli brachte das erwartete Ergebnis. Die Resistenzspektren haben sich beim Transfer zwischen R.lupini und E.coli nicht verändert. Zur weiteren Analyse wurde die PRR1-Sensitivität der in diesem Versuch entstandenen RP4-, RP4-2- und RP4-3-tragenden E.coli-Stämme getestet. Der PRR1-Phage konnte sämtliche Stämme lysieren.

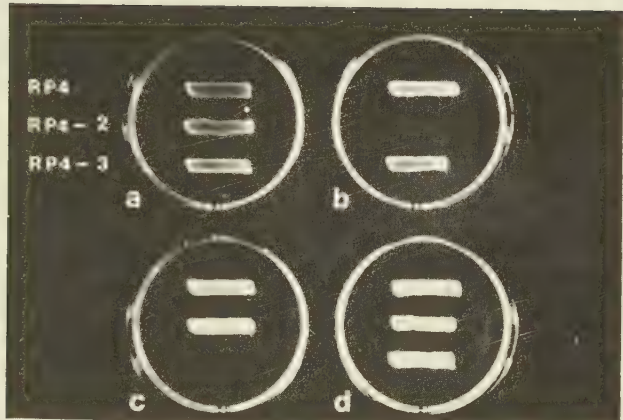


Abb. 10: Resistenzspektren von RP4-Mutanten in R.lupini

Die Stämme 1-624 (RP4), 1-624 (RP4-2) und 1-624 (RP4-3) wurden über Nacht in NB angezogen, mit der Öse auf NB (a), auf NB + AMP (b), auf NB + KAN (c) und NB + TET (d) ausgestrichen und anschließend bei 30°C inkubiert. Bei RP4-2 handelt es sich um die *amp*-s und bei RP4-3 um die *kan*-s Mutante des RP4-Faktors.

Tabelle IX: Transfer des RP4, RP4-2 und RP4-3-Faktors von R.lupini nach E.coli

Kreuzung		Anzahl der resistenten <u>E.coli</u> -Zellen pro ml selektiert auf den Medien		
Donor	Rezipient	MM + Amp	MM + Kan	MM + Tet
1-486 (RP4) ^{a)}	x K12	$8,9 \times 10^7$	$8,1 \times 10^7$	$7,6 \times 10^7$
1-624 (RP4) ^{a)}	x K12	$9,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$9,2 \times 10^7$
1-614 (RP4-2) ^{b)}	x K12	o	$1,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
1-624 (RP4-2) ^{b)}	x K12	o	$6,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$
1-624 (RP4-3) ^{c)}	x K12	$5,3 \times 10^7$	o	$6,4 \times 10^7$
1-486 (RP4-3) ^{c)}	x K12	$9,3 \times 10^7$	o	$5,6 \times 10^7$

Resistenzspektren: RP4 : amp-r, kan-r, tet-r
 RP4-2 : amp-s, kan-r, tet-r
 RP4-3 : amp-r, kan-s, tet-r

Verwendung fanden: a) die RP4-tragenden R.lupini-Stämme 1-486 und 1-624,
 b) zwei unabhängig voneinander isolierte RP4-2-tragende 1-624 Stämme und
 c) die RP4-3-tragenden R.lupini-Stämme 1-624 und 1-486

I E Diskussion

I E 1 RP4-Transfer zwischen R.lupini-Stämmen

Der RP4-Faktor wurde erstmals von Dr. Hedges (1971) von E.coli aus auf unseren Laborstamm R.lupini 1-250: prt, car-y übertragen. 1-250 (RP4) diente als Ausgangsmaterial für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente. Für den RP4-Transfer wurde gezeigt, daß er zwischen dem Bodenbakterium R.lupini und dem Enterobakterium E.coli in beiden in beiden Richtungen mit einer hohen Rate übertragen wird, wenn die Kreuzungen auf Festmedium durchgeführt werden (Burkardt et al., 1975).

Der Nachweis des RP4-Faktors in R.lupini-Zellen gelingt am einfachsten anhand seines Resistenzverhaltens gegenüber Kanamycin und Tetracyclin. Der RP4-Faktor steigert den MHK-Wert für Kanamycin von 2 µg/ml auf 128 µg/ml und für Tetracyclin von 1 µg/ml auf 64 µg/ml. Ampicillin ist für diesen Routinenachweis nicht geeignet, da R.lupini-Zellen ohne RP4-Faktor schon einen MHK-Wert zwischen 50 und 100 µg/ml aufweisen. Beachtung muß man allerdings einer spontanen Kanamycinresistenz (MHK >800 µg/ml) bei R.lupini schenken, die mit einer Rate von 10^{-7} auftritt. Mit Hilfe von Konjugationsexperimenten konnte gezeigt werden, daß diese Kanamycinresistenz chromosomal in der d-Region des R.lupini-Chromosoms in Nähe der his-Markierung (Heumann et al., 1973) codiert. Man kann annehmen, daß es sich hierbei analog wie bei E.coli (Apirion und Schlessinger, 1968) um eine ribosomale Mutation handelt. Da die Streptomycinresistenz von R.lupini -ebenfalls eine Ribosomenmutation- aber in der c-Region codiert (Pühler, 1971), muß man folgern, daß die ribosomalen Gene in R.lupini über das Chromosom verstreut liegen.

Der RP4-Transfer zwischen R.lupini-Stämmen wurde stets auf Festmedium durchgeführt, da mit dieser Methode höhere Ausbeuten erreicht werden. Diesbezüglich kann man annehmen, daß der Zellkontakt zwischen Donor- und Rezipientenzellen im Flüssigmedium nicht stabil genug ausgebildet wird, um den dort auftretenden Scherkräften zu widerstehen. Zum RP4-Transfer wurden meist Kreuzungen ausgewählt, in denen zur Gegenselektion des Donors Streptomycin verwendet werden konnte. Eine andere Möglichkeit, Donor- von Rezipientenzellen abzutrennen, ergab sich aus der Sternbildungsfähigkeit (sta-Eigenschaft) von R.lupini-Zellen. sta^+ -Donorzellen setzen sich im Reagenzglas ab, während sich sta^- -Rezipientenzellen im Überstand befinden. Auf diese Art und Weise erreicht man eine Entmischung der Kreuzungssuspension.

Mit Hilfe einer modifizierten "interrupted mating"-Methode wurde der RP4-Transfer in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Kreuzungspartner gemessen. Es wurde gefunden, daß eine R.lupini-Donorzelle den RP4-Faktor bevorzugt in der logarithmischen Phase transferiert, während eine Rezipientenzelle sowohl in der logarithmischen als auch in der stationären Phase den RP4-Faktor aufnehmen kann. Dieses Verhalten ist verständlich, wenn man in Betracht zieht, daß der RP4-Donor die für die Konjugation notwendigen zellulären Strukturen ausbilden muß und dazu natürlich eine leistungsfähige Proteinsynthese benötigt. Andererseits stehen diese Kompetenzphasen aber im Gegensatz zum chromosomalen Gentransfer des R.lupini-eigenen Konjugationssystems. Der R.lupini-Donor kann den chromosomalen Gentransfer nämlich erst gegen Ende der logarithmischen Phase durchführen (Pühler, 1971). Hierfür wurde ein Regulationsmechanismus postuliert, der eine Transferreplikation nach Beendigung der vegetativen Replikation erlaubt. Für den RP4-Transfer trifft eine solche Regulation also nicht zu.

I E 2 Inhibierung der Rhizobium lupini-Fertilität durch den RP4-Faktor

Es ist bekannt, daß R-Faktoren der Klasse fi^+ das E.coli-eigene Konjugationssystem inhibieren. Datta et al. (1971) haben nun gezeigt, daß der RP4-Faktor fi^- -Charakter besitzt, also die E.coli-Fertilität nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu kann er aber die R.lupini-Fertilität nahezu vollkommen inhibieren. Hierbei handelt es sich um eine echte Inhibierung, denn nach RP4-Verlust kann die ehemalige Donorzelle im gewohnten Maße chromosomalen Gentransfer durchführen. Interessant ist der molekulare Mechanismus der Fertilitätsinhibierung. Für R-Faktoren der Klasse fi^+ ist bekannt, daß sie einen Repressor produzieren, der den Konjugationstransfer unterbindet. Dieser Mechanismus funktioniert, da die RTF-Einheit des fi^+ -R-Faktors und

der in E.coli für den chromosomalen Gentransfer verantwortliche F-Faktor in vielerlei Hinsicht analoge Informationen tragen. Man kann aus der Fertilitätsinhibierung in E.coli also auf eine nahe Verwandtschaft der beteiligten Transferfaktoren schließen.

Überträgt man diesen Gedankengang auf die Fertilitätsinhibierung der R.lupini-Konjugation durch den RP4-Faktor, so kann man, von einem hypothetischen Repressormodell ausgehend, ebenfalls eine Verwandtschaft zwischen den Fertilitätsfaktoren Fc und Fd einerseits und der RTF-Einheit des RP4-Faktors andererseits postulieren. Es existieren aber noch andere Denkmöglichkeiten: Der R.lupini-Donor transferiert chromosomale Gene erst nach Beendigung der vegetativen Replikation (Pühler, 1971). Diese Regulation könnte nun durch die Anwesenheit eines RP4-Faktors in der Zelle derart beeinflusst werden, daß praktisch kein chromosomaler Gentransfer mehr stattfindet. Die Diskussion über den Mechanismus der Fertilitätsinhibierung soll an dieser Stelle nicht weitergeführt werden, da in Teil II noch wesentlich neue Ergebnisse zu dieser Frage hinzukommen.

Diskutiert werden soll aber noch die Frage, ob man die Fertilitätsinhibierung in R.lupini zur Klassifizierung von R-Faktoren benutzen kann. Dazu müßten sich die zu klassifizierenden R-Faktoren nach R.lupini übertragen lassen. Lebek (1974) hat sich dieser Frage gewidmet und versucht, eine große Anzahl von R-Faktoren aus P.aeruginosa auf unseren R.lupini-Stamm 1-486 zu übertragen. All diese Versuche verliefen negativ. Aus diesem Ergebnis, das nochmals die Sonderstellung des RP4-Faktors hervorhebt, ist abzulesen, daß an eine Klassifizierung von R-Faktoren über eine Fertilitätsinhibierung in R.lupini momentan nicht zu denken ist.

Zu erwähnen bleibt noch, daß wir neben dem RP4-Faktor auch den RP1-Faktor aus dem Labor von Prof. Richmond auf unsere R.lupini-Stämme übertragen haben und gleichfalls eine Konjugationsinhibierung feststellen konnten (Burkardt et al., 1975).

I E 3 Initiierung des chromosomalen Gentransfers durch den RP4-Faktor in Rhizobium lupini

Nach Erscheinen der ersten Arbeiten über den R-Faktor aus P.aeruginosa 1822, die vor allem sein Konjugationssystem und seinen weiten Wirtsbereich beschrieben, wurde versucht, diesen R-Faktor zum Konjugationstransfer von chromosomalen Genen einzusetzen. Stanisich und Holloway (1971) berichteten über die Initiierung des chromosomalen Gentransfers in P.aeruginosa durch den R1822-Faktor. Olsen und Gonzalez (1974) konnten mit Hilfe des RP1-Faktors das his-Operon aus E.coli nach artfremden Bakterien transferieren. In dieser Arbeit wird nun gezeigt, daß der RP4-Faktor, wenn auch nur mit geringer Frequenz, einige chromosomale Gene zwischen auxotrophen R.lupini-Stämmen transferieren kann. Hierzu ist es nötig, daß der RP4-Faktor an das R.lupini-Chromosom ankoppelt und bei eigenem Transfer chromosomale Gene überträgt. Diese Ankopplung an das Chromosom geschieht offenbar mit einer zu geringen Häufigkeit, um von einem leistungsfähigen Transfer chromosomaler Gene sprechen zu können.

I E 4 Das DNA-Degradationsmodell für den RP4- Faktor in der R.lupini-Zelle

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß der RP4-Faktor in der R.lupini-Zelle instabil vorliegt und spontan verlorenght. Außerdem konnten vom RP4-Faktor in R.lupini sowohl transferdefekte Mutanten als auch Mutanten mit verkürzter r-Determinante spontan mit einer Rate im Prozentbereich isoliert werden. Diese Beobachtungen sind für R.lupini

als Wirtszelle spezifisch. In E.coli liegt der RP4-Faktor z. B. stabil vor und Mutanten mit verkürzter r-Determinante entstehen nur beim Konjugationstransfer (Teil V D 1 dieser Arbeit). Diese Instabilität und die hohe Mutantenausbildung von RP4 in R.lupini sollen nun mittels eines speziellen Modells, das eine DNA-Degradation des RP4-Moleküls annimmt, diskutiert werden.

Zuerst zur Instabilität des RP4-Faktors in R.lupini:

Die Versuche der Abb. 6 zeigen, daß der Lebendtitel von R.lupini-Zellen in der Stationärphase stark abfällt.

Besitzen sie einen RP4-Faktor, so wird dieser mit fortschreitender Stationärphase eliminiert. Im Spiegel des DNA-Degradationsmodells bedeuten diese Beobachtungen,

1. daß das R.lupini-Chromosom in der Stationärphase stark abgebaut wird, woraus sich das Absinken des Lebendtiters erklären läßt, und
2. daß der RP4-Faktor einer noch stärkeren DNA-Degradation unterworfen ist, die den Verlust des RP4-Faktors aus den überlebenden Zellen erklären kann.

Dieses DNA-Degradationsmodell, das bis jetzt nur hypothetisch vorliegt, erklärt zumindest sehr plausibel die angeführten Ergebnisse.

Nun zu den transferdefekten RP4-Faktoren: In Abb. 7 wurde gezeigt, daß eine RP4-tragende R.lupini-Kultur spontan bis zu 10% transferdefekte RP4-Faktoren produzieren kann. Dieser hohe Prozentsatz könnte darauf hindeuten, daß die RTF-Einheit und die r-Determinante des RP4-Faktors unabhängig nebeneinander in der R.lupini-Zelle existieren. Geht die RTF-Einheit verloren und bleibt die r-Determinante in der Zelle zurück, so erhält man einen transferdefekten RP4-Faktor. Dieser Theorie widersprechen aber einige Beobachtungen: So konnten in RP4-tragenden R.lupini-Zellen keine zwei unabhängige Plasmide gefunden werden, die der RTF-Einheit und der

r-Determinante des RP4-Faktors entsprechen (Burkardt, 1974). Außerdem kann man mit einem totalen Verlust der RTF-Einheit auch nicht den beobachteten Resttransfer von transferdefekten RP4-Faktoren erklären. Im weiteren wurden mit Längenmessungen an transferdefekten RP4-Molekülen gezeigt, daß sie sich nur bis zu 20% vom intakten RP4-Faktor unterscheiden (Mattes, 1974). Zur Entstehung von transferdefekten RP4-Mutanten soll deshalb das DNA-Degradationsmodell herangezogen werden. Nimmt man an, daß nach partieller DNA-Degradation und Linearisierung des RP4-Moleküls dieses wiederum zyklisieren kann, so entsteht ein verkürzter R-Faktor, dem u. U. ein DNA-Fragment in der RTF-Einheit fehlt und der aus diesem Grund zu keinem Konjugationstransfer mehr fähig ist. Transferdefekten RP4-Faktoren mit Resttransfer würden demnach ein DNA-Abschnitt der RTF-Einheit fehlen, der zu einem hoch-effektiven Transfer notwendig ist.

Aus dieser Darstellung ist ersichtlich, daß das postulierte DNA-Degradationsmodell wiederum sehr eindrucksvoll die beobachteten Ergebnisse erklären kann.

Zuletzt zu den RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante: Falls man das DNA-Degradationsmodell für transferdefekte RP4-Faktoren als gültig annimmt, so muß man folgern, daß auf die gleiche Art auch RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante entstehen. Solche RP4-Mutanten wurden beobachtet, z. B. die ampicillinsensitive RP4-Mutante RP4-2 und die kanamycinsensitive RP4-Mutante RP4-3. Warum keine tetracyclinsensitive RP4-Mutante auftrat, ist nicht bekannt. Diese beschriebenen RP4-Mutanten wurden mit einer um den Faktor 10 geringeren Häufigkeit als die transferdefekten RP4-Faktoren isoliert. Dieser Faktor läßt sich mit der gegenüber der RTF-Einheit gewöhnlich viel kleineren r-Determinante erklären. Daß es sich bei diesen ampicillin- und kanamycinsensitiven RP4-tragenden R.lupini-Kolonien

um echte R-Faktormutanten handelt, konnte durch Transfer der entsprechenden RP4-Faktoren nach E.coli demonstriert werden. All diese RP4-Mutanten behielten ihr verkürztes Resistenzspektrum unverändert bei.

Welche Hinweise existieren nun für das DNA-Degradationsmodell? RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante werden nach dem DNA-Degradationsmodell durch Deletionen im R-Faktormolekül erklärt. Solche Deletionen können aber durch Größenbestimmung der entsprechenden RP4-Mutanten nachgewiesen werden. Mattes fand 1974, daß eine kanamycinsensitive RP4-Mutante aus R.lupini einen etwas geringeren s-Wert besitzt als der intakte RP4-Faktor. Längenmessungen nach elektronenmikroskopischer Darstellung einer analogen kanamycinsensitiven RP4-Mutante erbrachten ebenfalls eine Verkürzung der Konturlänge um rund 1 μm (Tucher, 1974).

Für das DNA-Degradationsmodell des RP4-Faktors in R.lupini sprechen aber noch andere Ergebnisse. Tucher untersuchte 1974 den RP4-Faktor in Minizellen von R.lupini. Da der von ihm benützte Stamm erst Minizellen am Ende der log-Phase segregierte, gelten seine DNA-Analysen für die Stationärphase. Tucher fand in Minizellen des RP4-tragenden Produzentenstammes den RP4-Faktor, dessen Konzentration allerdings davon abhing, zu welchem Zeitpunkt die Minizellen aus der Stationärphase geerntet wurden. Die Anzahl der intakten RP4-Faktoren nahm mit zunehmender Stationärphase des Produzentenstammes ab. Überraschenderweise traten dafür in den Minizellen aber kleinere DNA-Ringe auf, die eine Länge von $\approx 1 \mu\text{m}$ bis zu $10 \mu\text{m}$ aufwiesen, wobei um $3,6 \mu\text{m}$ eine deutliche Häufung auftrat. Tucher deutete diese DNA-Ringe als Abbauprodukte des RP4-Faktors in den Minizellen und lieferte damit einen molekularbiologischen Hinweis auf das in dieser Arbeit diskutierte DNA-Degradationsmodell.

Für die kanamycinsensitive Mutante des RP4-Faktors soll nochmals der postulierte Entstehungsmechanismus dargestellt werden (Abb. 11). Aus dem DNA-Molekül des RP4-Faktors wird in der R.lupini-Zelle ein DNA-Fragment herausgeschnitten, das die Information für die Kanamycinresistenz trägt. Nach Zirkularisierung der linearen Fragmente entstehen zwei DNA-Ringe, von denen der größere den RP4-3-Faktor -also die kanamycinsensitive Mutante des RP4-Faktors- darstellt. Der kleine Ring dagegen, der in der R.lupini-Zelle nicht repliziert wird und deshalb genetisch nicht mehr nachgewiesen werden kann, wurde von Tucher (1974) bei der DNA-Analyse von Minizellen RP4-tragender Produzentenstämmen gefunden. Offen bleibt die Frage nach der Zirkularisierung der linearen DNA-Fragmente. Man kann vermuten, daß die DNA-Degradation von sequenzspezifischen Nukleasen durchgeführt wird, die analog bekannter Restriktionsenzyme lineare Fragmente mit einsträngigen Enden erzeugen. Falls diese einsträngigen Enden invers homolog sind, können sie über eine normale Basenpaarung das lineare Fragment in einen Ring umwandeln.

In diesem Abschnitt wurde ein Modell benutzt, das die Instabilität und die beobachtete Mutantenausbildung des RP4-Faktors in R.lupini erklärt. Zur Nachprüfung dieses Modells sind jedoch noch weitere Versuche nötig. Insbesondere sollte der Frage nachgegangen werden, ob die postulierten sequenzspezifischen Nukleasen aus R.lupini isoliert werden können und ob sich die geforderten Eigenschaften in vitro nachweisen lassen.

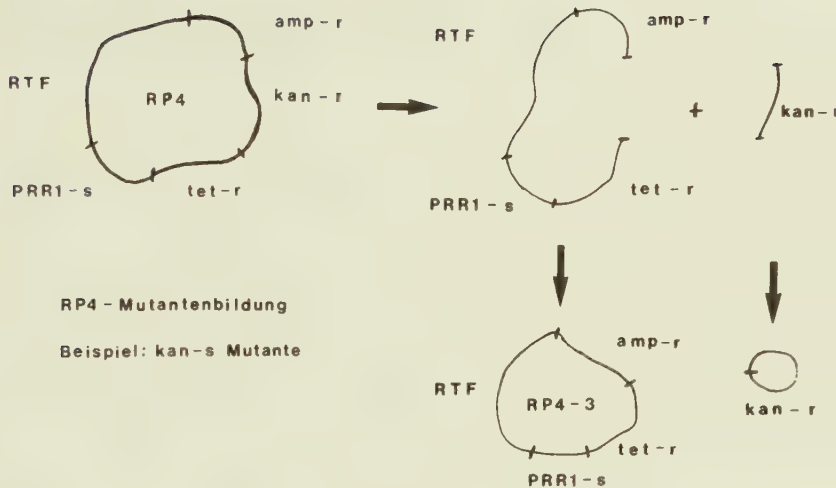


Abb. 11: Hypothetischer Mechanismus zur Entstehung der kanamycinsensitiven RP4-Mutante: RP4-3 (Erklärung siehe Text)

Teil II :

Die Fertilitätsinhibierung in Rhizobium lupini
durch transferdefekte RP4-Faktoren

		Seite
II	Die Fertilitätsinhibierung in <u>Rhizobium lupini</u> durch transfer- defekte RP4-Faktoren	62
II A	<u>Zusammenfassung</u>	64
II B	<u>Einleitung</u>	65
II C	<u>Material und Methoden</u>	66
II D	<u>Ergebnisse</u>	66
II D 1	Analyse und Typisierung von RP4- tragenden Kolonien des <u>R.lupini</u> - Stammes 1-491	66
II D 1.1	RP4-Transfer nach <u>R.lupini</u> 1-491	66
II D 1.2	Analyse der resistenten Kolonien von 1-491 nach RP4-Transfer	67
II D 1.3	Typisierung der resistenten Kolonien von 1-491 nach RP4-Transfer	69
II D 2	Versuche zur Veränderlichkeit des Kolonietyps	70
II D 2.1	Versuchsverfahren	70
II D 2.2	Veränderlichkeit des Kolonietyps + - +	71
II D 2.3	Veränderlichkeit des Kolonietyps + - -	74
II D 2.4	Veränderlichkeit des Kolonietyps + + -	76
II E	<u>Diskussion</u>	81
II E 1	Das fin-Gen des RP4-Faktors für die Fertilitätsinhibierung in <u>R.lupini</u>	81
II E 2	Veränderlichkeit der einzelnen Kolonietypen	83
II E 3	Der Mechanismus der Fertilitätsinhibierung	84

Es werden zwei Klassen von transferdefekten RP4-Faktoren nachgewiesen: Die eine Klasse inhibiert die R.lupini-eigene Fertilität, die andere dagegen nicht. Aus dieser Beobachtung kann man schließen, daß die RTF-Einheit des RP4-Faktors ein Gen trägt, das den chromosomalen, nicht aber den eigenen Transfer hemmt.

Der Resistenzfaktor RP4 aus P.aeruginosa inhibiert die R.lupini-eigene Fertilität. Diese Beobachtung hat ihr Analogon in der Fertilitätsinhibierung bei E.coli durch fi^+ R-Faktoren (Watanabe et al., 1964). Die Fertilitätsinhibierung bei E.coli beruht auf ähnlichen Transfer-einheiten des fi^+ R-Faktors und des Fertilitätsfaktors von E.coli. So konnte nachgewiesen werden, daß beide Transfereinheiten einen Sexpilus produzieren, der donor-spezifischen RNS-Phagen (z. B. MS2 oder Q $_{\beta}$) als Adsorptionsstelle dient. Die Fertilitätsinhibierung in E.coli beruht auf einem Regulationsmechanismus. Der fi^+ R-Faktor produziert einen Repressor, der die Ausprägung der Fertilitätsinformation auf dem F-Faktor und dem eigenen Plasmid unterdrückt. Dies konnte durch Isolierung von dereprimierten fi^+ R-Faktoren gezeigt werden, die keine Fertilitätsinhibierung mehr durchführen. Der komplexe Regulationsvorgang wurde von Finnegan und Willets (1973) aufgeklärt.

In den vorliegenden Experimenten soll nun in Anlehnung an die Ergebnisse bei E.coli nach RP4-Mutanten gesucht werden, die die Fertilität bei R.lupini nicht mehr inhibieren. Dazu werden Methoden aus Teil I dieser Arbeit benutzt. Der Wirt R.lupini produziert vom RP4-Faktor eine große Anzahl leicht isolierbarer RP4-Mutanten. Mit der Annahme, daß die Fertilitätsinhibierung in R.lupini von der Transfer-einheit des RP4-Faktors verursacht wird, ergibt sich die interessante Frage, ob transferdefekte RP4-Faktoren ebenfalls zur Fertilitätsinhibierung fähig sind. In dieser Arbeit werden zwei Klassen von transferdefekten RP4-Faktoren beschrieben: die eine Klasse inhibiert die R.lupini-Fertilität, die andere dagegen nicht.

II C Material und Methoden

Bakterienstämme und Methoden können Teil I Abschnitt C entnommen werden.

II D Ergebnisse

II D 1 Analyse und Typisierung von RP4-tragenden Kolonien des R.lupini-Stammes 1-491

Zur Untersuchung der Frage, ob transferdefekte RP4-Faktoren die Fertilität bei R.lupini inhibieren, wurde der RP4-Faktor auf den hochfertilen R.lupini-Stamm 1-491 übertragen. Davon wurden RP4-tragende Einzelkolonien isoliert und diese auf RP4-Transfer und Fertilität untersucht. Da transferdefekte RP4-Faktoren in R.lupini mit einer hohen Rate spontan auftreten (Teil I D 6), ist zur Isolierung dieser Mutanten kein spezielles Selektionsverfahren nötig.

II D 1.1 RP4-Transfer nach R.lupini 1-491

Der R.lupini-Stamm 1-491 trägt in der c-Region eine thi und eine str-r Markierung. Er ist in der Lage, sowohl die c-Region als auch die d-Region des R.lupini-Chromosoms zu übertragen (Heumann et al., 1973). Der RP4-Faktor wurde von dem Stamm 1-250 (RP4) : str-s auf 1-491 : str-r übertragen. Dieser RP4-Transfer wurde auf Festmedium durchgeführt. Dazu wurden die beiden Stämme gemeinsam auf NB-Agar ausgespatelt und bei 30° C für 24 Stunden bebrütet. Das Kreuzungsgemisch wurde anschließend in 10 ml NB + Str aufgenommen und über Nacht gerollert. Streptomycin diente zur Gegenselektion des Donors. Eine Verdünnungsreihe dieser Übernachtskultur wurde anschließend auf den selektiven Medien (NB + Amp + Str, NB + Tet + Str) ausgespatelt und die Anzahl der resistenten Kolonien des Stammes 1-491 nach RP4-Transfer bestimmt. Pro ml

Übernachtskultur ergaben sich $2,1 \times 10^5$ ampicillinresistente, 4×10^7 kanamycinresistente und $1,5 \times 10^6$ tetracyclinresistente Zellen.

II D 1.2 Analyse der resistenten Kolonien von 1-491 nach RP4-Transfer

Die resistenten Kolonien des Stammes 1-491 nach RP4-Transfer wurden nun einer ausführlichen genetischen Analyse unterworfen. Sie wurden mit Hilfe von Stempeltests auf Kanamycin- und Tetracyclinresistenz, auf RP4-Transfer und auf chromosomalen Gentransfer getestet. Diese Tests haben im einzelnen folgenden Inhalt:

- Resistenztest: Durch Nachprüfung der Kanamycin- und Tetracyclinresistenz wird sichergestellt, daß eine Kolonie des Stammes 1-491 den Resistenzfaktor RP4 trägt.
- RP4-Transfertest: Mit diesem Test wird gezeigt, ob eine RP4-tragende 1-491 Kolonie den RP4-Faktor transferieren kann, woraus man je nach Ergebnis auf eine intakte oder defekte Resistenztransfereinheit (RTF-Einheit) schließen kann.
- Fertilitätstest: Dieser Test gibt Auskunft darüber, ob eine 1-491 Kolonie mit oder ohne RP4 zum chromosomalen Gentransfer in der Lage ist.

Die angeführten Tests benutzen alle eine einfache Stempel-methode.

- Beim Resistenztest wird eine Ausgangsplatte mit RP4-tragenden Strichkolonien auf Kanamycin- oder Tetracyclinagar gestempelt und das Wachstum der Strichkolonien auf diesen Medien beobachtet (s. auch Teil I D 1.3).
- Beim RP4-Transfertest wird eine Ausgangsplatte mit RP4-tragenden Strichkolonien auf einen speziellen Rezipientenrasen gestempelt, der nur nach Erwerb des RP4-Faktors zum Wachstum befähigt ist (s. auch Teil I D 6.1).

- Beim Fertilitätstest schließlich wird eine Ausgangsplatte mit Donorkolonien auf einen Rezipientenrasen gestempelt, der wiederum erst nach chromosomalem Gen-transfer und Rekombination einer entsprechenden chromosomalen Markierung anwachsen kann (s. Teil I D 3.1).

Von den resistenten Kolonien des Stammes 1-491 wurden nach RP4-Transfer nun 16 amp-r, 16 kan-r und 16 tet-r Kolonien ausgewählt und diese als Strichkolonien auf NB-Platten übertragen. Nach Anwachsen der Strichkolonien wurden diese Platten für die oben angegebenen Stempeltests verwendet. Die Ergebnisse des Resistenz-, RP4-Transfer- und Fertilitätstests sind in Tabelle I zusammengefaßt. Beim Resistenztest wurde gefunden, daß sämtliche Kolonien die Kanamycin- und Tetracyclinresistenz besitzen, also die r-Determinante des RP4-Faktors beinhalten. Der Transfer-test zeigte, daß 28 Kolonien zum RP4-Transfer fähig sind und daß die restlichen 20 Kolonien diese Eigenschaft verloren haben. Auch hier treten also die schon in Teil I D 6 beschriebenen transferdefekten RP4-Faktoren auf. Der Fertilitätstest erbrachte schließlich, daß 45 von den getesteten 48 Kolonien die durch den RP4-Faktor hervorgerufene Fertilitätsinhibierung zeigen. 3 Kolonien machen allerdings eine Ausnahme und transferieren chromosomale Gene. Hierbei handelt es sich, wie sich später zeigen wird, um transferdefekte RP4-Faktoren, die die Fertilität von R.lupini-Zellen nicht mehr inhibieren.

Tabelle I: Resistenz-, RP4-Transfer- und Fertilitätstest von resistenten 1-491 Kolonien nach RP4-Transfer

Resistenz a)	RP4-Transfer b)	Fertilität c)	Anzahl der Kolonien
+	+	-	28
+	-	-	17
+	-	+	3
Summe			48
a) Resistenztest: + : Kanamycin- und Tetracyclinresistenz - : Kanamycin- und Tetracyclinsensitivität			
b) RP4-Transfertest: Rezipientenrasen: 1-250: prt, car-y Transfermedium: MM-Agar + Kanamycinzusatz (30µg/ml) + : RP4-Transfer nach 1-250 - : kein RP4-Transfer nach 1-250			
c) Fertilität: Rezipientenrasen: 1-723: pro, car-y und 1-486: ilv, car-y Kreuzungsmedium: MM + NB-Agar + : chromosomaler Gentransfer von 1-491 nach 1-723 und 1-486 - : kein chromosomaler Gentransfer von 1-491 nach 1-723 und 1-486			

II D 1.3 Typisierung der resistenten Kolonien von 1-491 nach RP4-Transfer

Von besonderem Interesse ist die Frage, in welchen Kombinationen die Eigenschaften "RP4-Resistenz, RP4-Transfer und Fertilität" in den resistenten Kolonien des Stammes 1-491 nach RP4-Transfer auftreten. Tabelle I gibt auch darüber Auskunft. Aus den dort dargestellten Ergebnissen kann man eine Einteilung der resistenten Kolonien in verschiedene Typenklassen ableiten. Zur Typisierung wird eine Dreiersequenz aus den Zeichen "+" und "-" verwendet, deren einzelne Positionen folgende Bedeutung haben: Die erste Position gibt das Ergebnis des Resistenztests, die zweite Position das Ergebnis des RP4-Transfertestes und die dritte Position das Ergebnis des Fertilitätstests an. + + - bedeutet demnach, daß es sich um eine Kolonie

mit folgenden Eigenschaften handelt: Resistenz +, RP4-Transfer + und Fertilität -. Zellen dieser Kolonie beinhalten also einen transferierbaren RP4-Faktor und zeigen keinen chromosomalen Gentransfer. Mit dieser Nomenklatur lassen sich die Ergebnisse der Tabelle I wie folgt darstellen: Von 48 Kolonien zeigen

28 den Kolonietyp + + - ,
17 den Kolonietyp + - - und
3 den Kolonietyp + - + .

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, daß der Kolonietyp nicht automatisch mit dem Genotyp der die Kolonie aufbauenden Zellen gleichzusetzen ist. Dies soll an dem verhältnismäßig selten auftretenden Kolonietyp + - + diskutiert werden. Diese Kolonie zeigt trotz eines vorhandenen RP4-Faktors chromosomalen Gentransfer. Daraus ergibt sich die Frage, ob es sich hierbei um eine genetisch homogen oder heterogen zusammengesetzte Kolonie handelt. Im homogenen Fall stimmt der Kolonietyp mit dem Genotyp der einzelnen Zellen überein. Im heterogenen Fall dagegen ergibt sich der Kolonietyp aus den beiden unterschiedlichen genetischen Zelltypen + - - und - - +. Welche der beiden Möglichkeiten verwirklicht ist, soll im nächsten Punkt geklärt werden.

II D 2 Versuche zur Veränderlichkeit des Kolonietyps

II D 2.1 Versuchsverfahren

Der RP4-Faktor zeigt in R. lupini ein sehr instabiles Verhalten (Teil I D 5) und wird spontan eliminiert. Es ist nun interessant, in welcher Weise sich die obigen Kolonietypen verändern, wenn der RP4-Faktor aus der R. lupini-Zelle eliminiert oder verändert wird. Zu diesem Zwecke wurden von den Kolonietypen + - -, + + - und + - + jeweils

Repräsentanten ausgewählt und diese für das folgende Experiment verwendet. Die ausgewählten Kolonien wurden in frisches Nährmedium überimpft und über Nacht gerollert. Von diesen Ö-Kulturen wurden durch Ausplattierung von Verdünnungsreihen Einzelkolonien erzeugt und diese als Strichkolonien auf Ausgangsplatten übertragen, die dann erneut einem Resistenz-, RP4-Transfer- und Fertilitätstest unterworfen wurden.

II D 2.2 Veränderlichkeit des Kolonietyps + - +

Bei diesem Typ handelt es sich also um Kolonien, die einen transferdefekten RP4-Faktor besitzen und gleichzeitig chromosomalen Gentransfer durchführen. Unterwirft man solche Kolonien der oben angegebenen Prozedur, so bekommt man als Ergebnis die Stempelplatten der Abb. 1 und 2, die folgende Informationen liefern:

- 1.) Aus dem Resistenztest kann man ablesen, daß ein Großteil der Kolonien den RP4-Faktor verloren hat.
- 2.) Der RP4-Transfertest zeigt, daß keine Kolonie die RP4-transferfähigkeit zurückgewonnen hat.
- 3.) Der Fertilitätstest schließlich liefert die Information, daß sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit dieses speziellen RP4-Faktors chromosomaler Gentransfer möglich ist.

Überträgt man diese Ergebnisse in die Sprache der Kolonietypen, so kommt man zur folgenden Aussage: Nach Durchführung der oben angegebenen Prozedur spaltet sich Kolonietyp + - + in die Kolonietypen + - + und - - + auf. Diese Veränderung kann alleine aus dem Spontanverlust des RP4-Faktors erklärt werden.

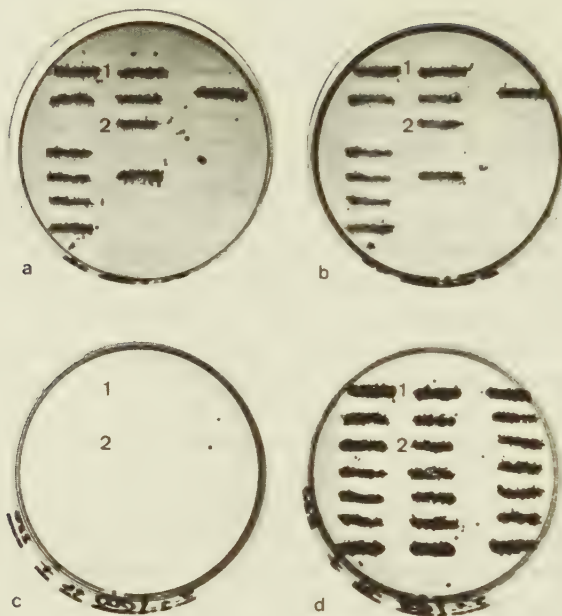


Abb. 1: Veränderlichkeit des Kolonietyps + - + einer 1-491 (RP4) Kolonie

Von der 0-Kultur einer 1-491 (RP4) Kolonie vom Kolonietyp + - + wurden 21 Strichkolonien auf NB-Agar angelegt und diese auf Resistenz, RP4-Transfer und Fertilität getestet. Abgebildet sind die Stempelplatten der Tests auf

- a) Kanamycinresistenz,
- b) Tetracyclinresistenz,
- c) RP4-Transfer (Rezipientenrasen: 1-250) und
- d) Fertilität (Rezipientenrasen: 1-723).

Folgende Kolonietypen treten auf:

Kolonietyp	Anzahl	Beispiel
+ - +	11	Kolonie Nr. 1
- - +	10	Kolonie Nr. 2

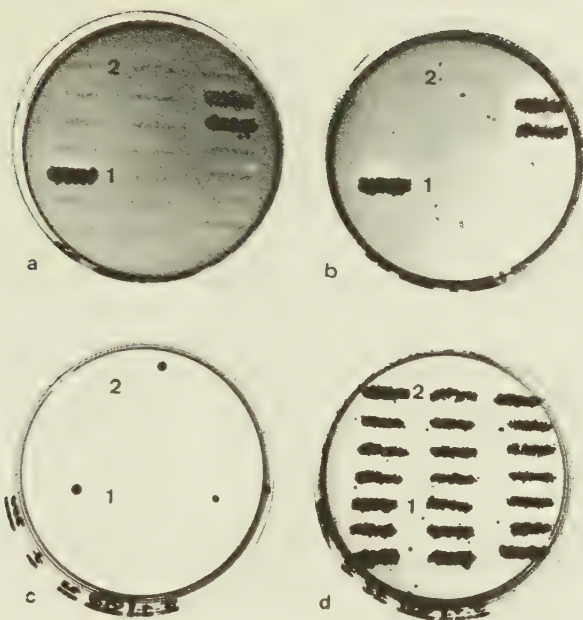


Abb. 2: Veränderlichkeit des Kolonietyps + - + einer 1-491 (RP4) Kolonie

Von der Ü-Kultur einer 1-491 (RP4) Kolonie vom Kolonietyp + - + wurden 21 Strichkolonien auf NB-Agar angelegt und diese auf Resistenz, RP4-Transfer und Fertilität getestet. Abgebildet sind die Stempelplatten der Tests auf

- a) Kanamycinresistenz,
- b) Tetracyclinresistenz,
- c) RP4-Transfer (Rezipientenrasen: 1-250) und
- d) Fertilität (Rezipientenrasen: 1-723).

Folgende Kolonietypen treten auf:

Kolonietyp	Anzahl	Beispiel
+ - +	3	Kolonie Nr. 1
- - +	18	Kolonie Nr. 2

Im Abschnitt II D 1.3 dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Kolonietyp und Genotyp der einzelnen Zelle diskutiert. Speziell bei dem Kolonietyp + - + war diese Frage nicht klar zu beantworten. Nach Durchführung dieses Experiments kann aus dem Fehlen des Kolonietyps + - - aber geschlossen werden, daß der Kolonietyp + - + mit dem genetischen Typ der die Kolonie aufbauenden Zellen übereinstimmt. Wir haben -um diesen Punkt abzusichern- aus dem Experiment der Abb. 1 eine weitere Kolonie vom Typ + - + ausgewählt und dem gleichen Test unterworfen. Auch hierbei fanden wir wiederum nur die Typen + - + und - - +. Dieser Befund ist also reproduzierbar.

Mit diesem Experiment ist also gezeigt, daß es spezielle transferdefekte RP4-Faktoren in R.lupini-Zellen gibt, die die R.lupini-eigene Fertilität nicht inhibieren.

II D 2.3 Veränderlichkeit des Kolonietyps + - -

Bei diesem Typ handelt es sich um Kolonien, die einen transferdefekten RP4-Faktor besitzen und keinerlei chromosomalen Gentransfer ausführen. Dieser Kolonietyp ist übrigens identisch mit dem Genotyp der einzelnen Zellen dieser Kolonie, da der Genotyp - - -, also eine Zelle ohne chromosomalen Gentransfer für den verwendeten Stamm 1-491 nicht existiert. Unterwirft man nun eine Kolonie des Typs + - - der oben beschriebenen Prozedur, also einer Passage im antibiotikafreien Medium, so bekommt man als Ergebnis die Stempelplatten der Abb. 3. Aus diesen Stempelplatten kann man folgende Erkenntnisse ablesen:

- 1.) Der Resistenztest liefert einige Kolonien, die RP4-frei sind.
- 2.) Der RP4-Transfertest zeigt wiederum, daß der Verlust der RP4-Transferfähigkeit nicht rückgängig gemacht

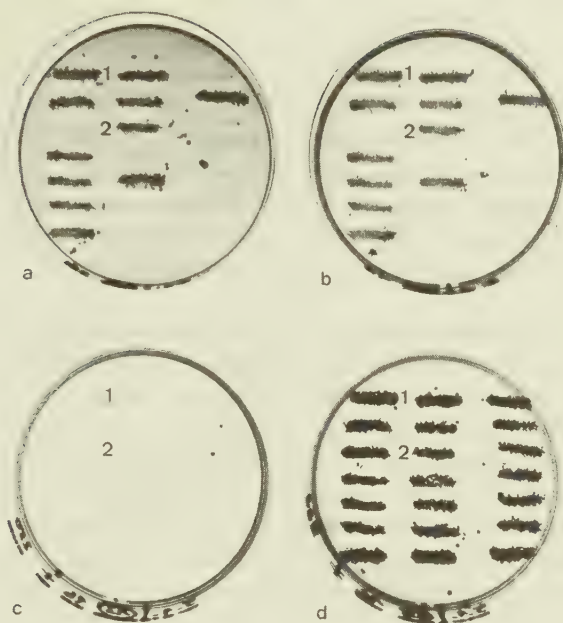


Abb. 3: Veränderlichkeit des Kolonietyps + - - einer 1-491 (RP4) Kolonie

Von der Ü-Kultur einer 1-491 (RP4) Kolonie vom Kolonietyp + - - wurden 21 Strichkolonien auf NB-Agar angelegt und diese auf Resistenz, RP4-Transfer und Fertilität getestet. Abgebildet sind die Stempelplatten der Tests auf

- a) Kanamycinresistenz,
- b) Tetracyclinresistenz,
- c) RP4-Transfer (Rezipientenrasen: 1-25o) und
- d) Fertilität (Rezipientenrasen: 1-723).

Folgende Kolonietypen treten auf:

Kolonietyp	Anzahl	Beispiel
+ - -	17	Kolonietyp Nr. 1
- - +	2	Kolonietyp Nr. 2
+ - +	2	Kolonietyp Nr. 3

werden kann.

- 3.) Aus dem Fertilitätstest ist ersichtlich, daß zumindest 4 Kolonien zum normalen chromosomalen Gentransfer zurückgekehrt sind. Der schwach ausgeprägte chromosomale Gentransfer der restlichen Kolonien kann als negativ gewertet werden.

Insgesamt ergibt sich daraus folgende Veränderung des Kolonietyps + - -. Neben den 17 Kolonien des Typs + - - treten je zweimal die Typen - - + und + - + auf. Der Typ - - + ergibt sich wieder sehr einfach aus dem Verlust des RP4-Faktors, wodurch die Fertilitätsinhibierung in diesen Zellen aufgehoben wird. Im Gegensatz dazu kann das Auftreten des Typs + - + nur durch eine Veränderung des RP4-Faktors in der R.lupini-Zelle erklärt werden, einer Veränderung, die schließlich wieder chromosomalen Gentransfer zuläßt.

II D 2.4 Veränderlichkeit des Kolonietyps + + -

Bei diesem Typ handelt es sich um Kolonien, die einen intakten RP4-Faktor besitzen, der die R.lupini-Fertilität inhibiert. Dieser Kolonietyp entspricht dem Genotyp der einzelnen Zellen dieser Kolonie. Der Grund hierfür ergibt sich wiederum aus dem Fehlen von Zellen mit dem Typ - - -. Die Veränderlichkeit des Typs + + - ist anhand von zwei Beispielen in Abb. 4 und Abb. 5 dargestellt. Man findet folgende Ergebnisse:

- 1.) Der Resistenztest zeigt einige RP4-freie 1-491 Kolonien.
- 2.) Der RP4-Transfertest bringt das Resultat, daß bis auf eine Ausnahme (Abb. 4 Kolonie Nr. 4) die RTF-Einheit des RP4-Faktors in resistenten Zellen von 1-491 unverändert vorliegt. Bei der erwähnten Ausnahme handelt es sich demnach um einen transferdefekten RP4-Faktor.

3.) Der Fertilitätstest liefert das Ergebnis, daß nach RP4-Verlust in allen Kolonien von 1-491 der chromosomale Gentransfer wieder rekonstituiert wird. Allerdings ergeben sich zusätzlich noch 2 RP4-tragende Kolonien mit Fertilität. Es handelt sich jeweils um die Kolonie Nr. 3 der Abb. 4 und Abb. 5.

Damit ergibt sich für die Veränderlichkeit des Typs + + - folgende Situation. Neben dem Typ + + - treten noch die Typen - - +, + - - und + + + auf. Der Typ - - + kommt durch einen einfachen RP4-Verlust zustande, wodurch die Fertilitätsinhibierung aufgehoben wird. Der Typ + - - läßt sich dagegen nur über eine Veränderung des RP4-Faktors vom transferfähigen zum transferdefekten Zustand erklären.

Nicht zu verstehen ist allerdings der Kolonietyp + + +, also eine Kolonie mit einem intakten RP4-Faktor und gleichzeitigem chromosomalen Gentransfer. Hier kann man allerdings vermuten, daß es sich um eine heterogene Kolonie handelt, die aus Zellen des Genotyps + + - und - - + zusammengesetzt ist. Wir haben deshalb Einzelkolonien von dieser fraglichen Kolonie nochmals der gleichen Analyse unterworfen und dabei das Ergebnis der Abb. 6 erhalten. Es ist sehr deutlich zu sehen, daß der Kolonietyp + + + aus den beiden Genotypen + + - und - - + zusammengesetzt ist. Der Genotyp + + + existiert also nicht.

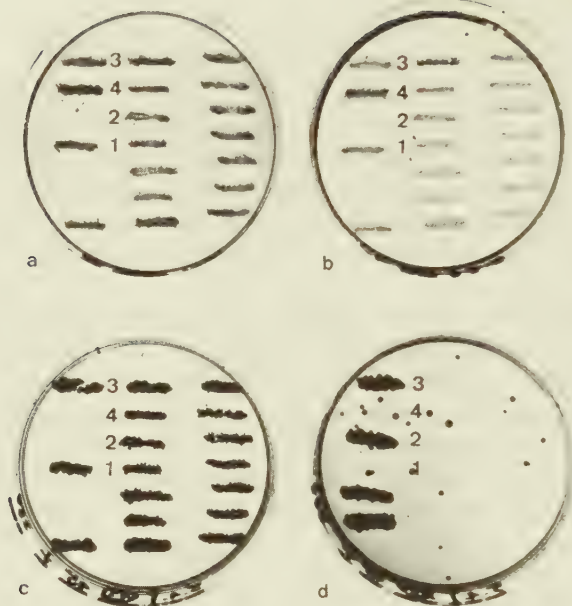


Abb. 4: Veränderlichkeit des Kolonietyps + + - einer 1-491 (RP4) Kolonie

Von der Ü-Kultur einer 1-491 (RP4) Kolonie vom Kolonietyp + + - wurden 21 Strichkolonien auf NB-Agar angelegt und diese auf Resistenz, RP4-Transfer und Fertilität getestet. Abgebildet sind die Stempelplatten der Tests auf

- a) Kanamycinresistenz,
- b) Tetracyclinresistenz,
- c) RP4-Transfer (Rezipientenrasen: 1-250) und
- d) Fertilität (Rezipientenrasen: 1-723).

Folgende Kolonietypen treten auf:

Kolonietyp	Anzahl	Beispiel
+ + -	16	Kolonie Nr. 1
- - +	3	Kolonie Nr. 2
+ + +	1	Kolonie Nr. 3
+ - -	1	Kolonie Nr. 4

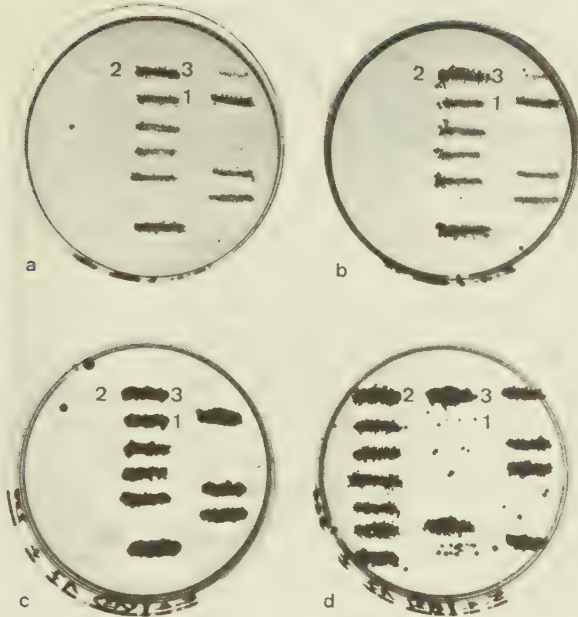


Abb. 5: Veränderlichkeit des Kolonietyps + + - einer 1-491 (RP4) Kolonie

Von der Ü-Kultur einer 1-491 (RP4) Kolonie vom Kolonietyp + + - wurden 21 Strichkolonien auf NB-Agar angelegt und diese auf Resistenz, RP4-Transfer und Fertilität getestet. Abgebildet sind die Stempelplatten der Tests auf

- a) Kanamycinresistenz,
- b) Tetracyclinresistenz,
- c) RP4-Transfer (Rezipientenrasen: 1-250) und
- d) Fertilität (Rezipientenrasen: 1-723).

Folgende Kolonietypen treten auf:

Kolonietyp	Anzahl	Beispiel
+ + -	8	Kolonie Nr. 1
- - +	12	Kolonie Nr. 2
+ + +	1	Kolonie Nr. 3

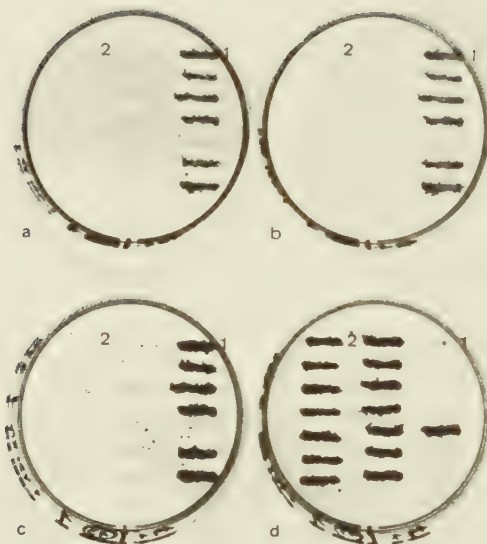


Abb. 6: Veränderlichkeit des Kolonietyps + + + einer 1-491 (RP4) Kolonie

Von der Ü-Kultur einer 1-491 (RP4) Kolonie vom Kolonietyp + + + wurden 21 Strichkolonien auf NB-Agar angelegt und diese auf Resistenz, RP4-Transfer und Fertilität getestet. Abgebildet sind die Stempelplatten der Tests auf

- a) Kanamycinresistenz
- b) Tetracyclinresistenz,
- c) RP4-Transfer (Rezipientenrasen: 1-250) und
- d) Fertilität (Rezipientenrasen: 1-723).

Folgende Kolonietypen treten auf:

Kolonietyp	Anzahl	Beispiel
+ + -	6	Kolonie Nr. 1
- - +	15	Kolonie Nr. 2

II E Diskussion

II E 1 Das fin-Gen des RP4-Faktors für die Fertilitäts- inhibierung in R.lupini

In den vorliegenden Experimenten wurde die Wechselwirkung des RP4-Faktors mit dem Fertilitätssystem von R.lupini ausführlich analysiert. Dabei konnten eine Reihe von RP4-Faktoren isoliert werden, die dem R.lupini-Stamm 1-491 unterschiedliche Eigenschaften verleihen. Zur Charakterisierung dieser RP4-Faktoren wurde eine Typisierung RP4-tragender Kolonien durchgeführt, wozu eine Dreiersequenz aus den Zeichen + und - geschaffen wurde. Die 1. Position dieser Dreiersequenz kennzeichnet die r-Determinante des RP4-Faktors, die 2. Position den RP4-Transfer und die 3. Position die Fertilität der entsprechenden RP4-Kolonie. In Tabelle II sind die auftretenden Kolonietypen nochmals zusammengefaßt. Sie sind identisch mit den Genotypen der die Kolonie aufbauenden Bakterienzellen. Kolonietypen, die sich auf Grund einer heterogenen Zusammensetzung der Kolonie aus unterschiedlichen genetischen Typen ergeben, wurden nicht berücksichtigt (z. B. + + +). Zu den einzelnen in Tabelle II aufgeführten Kolonietypen ist folgendes zu bemerken.

Die Typen + + - und - - + sind schon aus Teil I D 3 bekannt. Es handelt sich um den RP4-Wildtyp, der die R.lupini-eigene Fertilität inhibiert (+ + -) und die RP4-freie R.lupini-Zelle (- - +). Interessant sind aber nun die Typen + - - und + - +. Diese Kolonien enthalten alle transferdefekte RP4-Faktoren, die entweder die R.lupini-Fertilität inhibieren (+ - -) oder einen chromosomalen Gentransfer erlauben (+ - +). Was bedeutet dieses Ergebnis?

Tabelle II: Kolonietypen von 1-491 Kolonien mit und ohne RP4-Faktor

Resistenz +	Kolonietypen		Erklärung dieser Kolonietypen auf zellulärer Ebene
	RP4-Transfer +	Fertilität -	
			1-491 Zelle mit Wildtyp-RP4-Faktor, der die Fertilität inhibiert
+	-	-	1-491 Zelle mit transferdefektem RP4- Faktor, der die Fertilität inhibiert
+	-	+	1-491 Zelle mit transferdefektem RP4- Faktor, der die Fertilität nicht in- hibiert
-	-	+	RP4-freie 1-491 Zelle mit Fertilität

Zur Entstehung der transferdefekten RP4-Faktoren wurde in Teil I E 4 eine DNA-Degradation diskutiert, die über eine Deletionsausbildung im RP4-Molekül zu solchen Mutanten führt. Nehmen wir nun an, daß auf der RTF-Einheit des RP4-Faktors ein Gen für die Fertilitätsinhibierung existiert, das im weiteren fin (von Fertilitätsinhibierung) genannt werden soll, so können mit Hilfe des Degradationsmodells die Typen + - - und + - + erklärt werden. Entsteht z. B. in der RTF-Einheit des RP4-Faktors eine Deletion, die das fin-Gen nicht miteinschließt, so liegt ein transferdefekter RP4-Faktor vor, der die Fertilität inhibiert (+ - -). Andererseits ist diese Fertilitätsinhibierung aufgehoben, wenn die postulierte Deletion das fin-Gen mit umfaßt. Da nur transferdefekte (tra^-) RP4-Faktoren mit aufgehobener Fertilitätsinhibierung (fin^-) gefunden wurden, kann man schließen, daß das fin-Gen ein

notwendiges Gen für den RP4-Transfer darstellt. Aus der geringen Häufigkeit, mit der RP4-Faktoren mit den Eigenschaften tra^- , fin^- gegenüber tra^+ , fin^+ gefunden wurden, kann man übrigens schließen, daß das fin -Gen nur einen kleinen Teil der RTF-Einheit des RP4-Faktors ausmacht.

Insgesamt wurden mit diesen Experimenten drei Klassen (A, B und C) von genetisch unterschiedlichen RP4-Faktoren beschrieben, deren Eigenschaften nochmals in Abb. 7 zusammengefaßt sind.

Kolonietypp	der den Kolonietypp verursachte RP4-Faktor	beobachtete Übergänge zwischen diesen Typen
(A) + + -	$\text{r}^+ \text{tra}^+ \text{fin}^+$	
(B) + - -	$\text{r}^+ \text{tra}^- \text{fin}^+$	
(C) + - +	$\text{r}^+ \text{tra}^- \text{fin}^-$	
(D) - - +	$\text{r}^- \text{tra}^- \text{fin}^-$	

Abb. 7: Darstellung der RP4-Klassen und ihrer Übergänge

Erklärung der Kolonietypen: Teil II D 1.3

r : Resistenzdeterminante

tra : Transfereigenschaft

fin : Fertilitätsinhibierung

II E 2 Veränderlichkeit der einzelnen Kolonietypen

Zur Veränderlichkeit der einzelnen Kolonietypen wurden Repräsentanten der Klassen + - -, + + - und + - + für einige Zeit im antibiotikafreien Medium gezogen. Anschließend wurden Einzelkolonien von diesen Kulturen auf Resistenz, RP4-Transfer und Fertilität untersucht. Dabei ergaben sich

die folgenden allgemeinen Beobachtungen:

- 1.) Bei allen untersuchten Kolonien konnte spontaner RP4-Verlust festgestellt werden.
- 2.) Für keinen transferdefekten RP4-Faktor wurde eine Rekonstitution der Transferfähigkeit beobachtet.
- 3.) Nach Verlust des RP4-Faktors erwiesen sich alle R.lupini-Kolonien als fertil.

Diese Beobachtungen stützen die in Teil I beschriebenen Ergebnisse, die den Spontanverlust des RP4-Faktors, das Auftreten von transferdefekten RP4-Faktoren und die Fertilitätsinhibierung durch den RP4-Faktor betrafen.

Die Ergebnisse zur Veränderlichkeit der einzelnen Kolonietypen wurden in Abb. 7 zusammengestellt. Man erkennt, daß bei der gewählten Anordnung der Kolonietypen Übergänge zwischen diesen Typen nur in einer Richtung -nämlich von oben nach unten- möglich sind. Diese Anordnung ergibt sich aus der Vorstellung, daß von oben nach unten jeweils ein spezieller Teil des RP4-Faktors ausfällt. Dies sind der Reihe nach vom RP4-Wildtyp ausgehend zunächst ein Teil der RTF-Einheit, dann das *fin*-Gen und schließlich das gesamte Plasmid. Diese Vorstellung stimmt mit dem Modell der Deletionsausbildung im RP4-Molekül auf Grund von DNA-Degradation überein.

II E 3 Der Mechanismus der Fertilitätsinhibierung

Aus den vorliegenden Experimenten läßt sich ableiten, daß auf dem RP4-Faktor ein Gen existiert, das für die Fertilitätsinhibierung bei R.lupini verantwortlich ist. Dieses *fin*-Gen erweist sich für den RP4-Transfer als notwendig und gehört demnach zur RTF-Einheit des RP4-Faktors. Über den Mechanismus der Fertilitätsinhibierung selbst sind nur Vermutungen möglich. Man kann jedoch schließen, daß

das Produkt des fin-Gens als eine Art Repressor für die R.lupini-eigenen Fertilitätsfaktoren Fc und Fd wirkt. Hierbei handelt es sich anscheinend um eine sehr stabile Repression, denn -wie die Ergebnisse aus Teil I D 3.2 zeigen- unterbindet der RP4-Faktor den chromosomalen Gentransfer nahezu vollkommen. Andererseits scheint das fin-Produkt aber nicht den Transfer des RP4-Faktors zu regulieren, da alle Versuche, dereprimierte RP4-Faktoren zu isolieren, bis jetzt erfolglos verliefen. Diese Annahme kann auch der Arbeit von Olsen und Shipley (1973) entnommen werden, die den R1822-Faktor schon als dereprimiert betrachten. Man kann daraus schließen, daß das fin-Produkt für den RP4-Faktor selbst keinen Repressor darstellt, daß es als solcher aber auf die Fertilitätsfaktoren bei R.lupini wirkt. Ob diese Repression in den Regulationsvorgang eingreift, der einen chromosomalen Transfer erst nach Beendigung der vegetativen Replikation erlaubt (Teil I E 2), kann mit diesen Experimenten nicht entschieden werden.

Teil III :

Abspaltung einer transferierbaren Ampicillin-
resistenz vom RP4-Faktor in Escherichia coli

	Seite
III	Abspaltung einer transferierbaren Ampicillinresistenz vom RP4-Faktor in <u>Escherichia coli</u>
	86
III A	<u>Zusammenfassung</u>
	89
III B	<u>Einleitung</u>
	90
III C	<u>Material und Methoden</u>
	91
III D	<u>Ergebnisse</u>
	94
III D 1	Analyse des RP4-Transfers zwischen <u>E.coli</u> -Stämmen mit Hilfe einer "interrupted mating"-Technik: Entdeckung einer isoliert auftretenden Ampicillinresistenz
	94
III D 2	Abspaltung des RP4-1K-Faktors in Abhängigkeit vom Kreuzungsmedium
	96
III D 3	Der Einfluß der rec-Funktion in Donor und Rezipient auf den RP4-Transfer und die Entstehung des RP4-1K-Faktors
	98
III D 3.1	RP4-Transfer mit rekombinationsdefekten Rezipienten
	98
III D 3.2	RP4-Transfer mit rekombinationsdefekten Donoren
	100
III D 4	Analyse von RP4-1K-Faktoren
	100
III D 4.1	PRR1-Resistenz von RP4-1K-tragenden Zellen
	101
III D 4.2	Transfer des RP4-1K-Faktors
	102
III D 4.3	Initiierung des chromosomalen Gen-transfers durch den RP4-1K-Faktor
	102
III E	<u>Diskussion</u>
	107
III E 1	Extrachromosomale Natur der isoliert auftretenden Ampicillinresistenz
	107

	Seite
III E 2	Verwandtschaft zwischen dem RP4- und dem RP4-1K-Faktor 107
III E 3	Herkunft und Entstehung des RP4- 1K-Faktors 108
III E 4	Einfluß der Kreuzungsmedien auf die Abspaltung des RP4-1K-Faktors 110
III E 5	Der Einfluß der rec-Funktion in Donor und Rezipient auf den RP4- Transfer und die RP4-1K-Abspaltung 111
III E 6	Charakterisierung des RP4-1K-Faktors 112
III E 7	Das RP4-1K-Problem aus der Sicht anderer Autoren 112
III E 8	Die molekulare Gestalt des RP4- 1K-Faktors 115

III A Zusammenfassung

Nach Konjugationsexperimenten mit dem RP4-Faktor tritt in E.coli-Rezipientenzellen eine isolierte Ampicillinresistenz auf, die alle Eigenschaften eines Resistenzfaktors (RP4-1K genannt) trägt: RP4-1K ist selbsttransmissibel, etabliert sich in recA-Stämmen und induziert im geringen Maße in E.coli chromosomalen Gentransfer. Für die Entstehung des RP4-1K-Faktors wird eine Abspaltung vom RP4-Faktor postuliert. Diese Abspaltung wird in Gegenwart von Mg^{++} Ionen (0,05M) verstärkt, während sie von Ca^{++} Ionen (0,05 M) vollkommen unterdrückt wird.

III B Einleitung

In den beiden vorhergehenden Teilen dieser Arbeit wurde der Resistenzfaktor RP4 in dem Bodenbakterium R.lupini charakterisiert. Er liegt instabil vor, neigt zur Ausbildung von R-Faktormutanten und inhibiert die R.lupini-eigene Konjugation. Diese Eigenschaften konnten nur in R.lupini und nicht in E.coli festgestellt werden.

In E.coli dagegen offenbart der RP4-Faktor ein weiteres interessantes Verhalten. Nach Konjugationstransfer tritt in der Rezipientenzelle mit hoher Wahrscheinlichkeit eine isolierte Ampicillinresistenz auf, die alle Eigenschaften eines selbständigen Resistenzfaktors trägt: Transmissibilität, Etablierung in *recA*-Stämmen und Initiierung von chromosomalen Gentransfer. Die Charakteristika dieser isoliert auftretenden Ampicillinresistenz werden in dem vorliegenden Teil der Arbeit ausführlich beschrieben.

III C Material und Methoden

III C 1 E.coli-Stämme, RP4-Faktor und PRR1-Phage

Die in diesem Teil der Arbeit verwendeten E.coli-Stämme sind in Tabelle I zusammengefaßt. Ihre genetischen Markierungen und ihre Herkunft sind dort angegeben.

Tabelle I: E.coli-Stämme

Bezeichnung	Fertilität	Genetische Markierungen	Herkunft
K12	F ⁻	prt	Schmitt, Universität Regensburg
K12-1	F ⁻	prt, str-r	spontan resistente Mutante von K12
NC22	F ⁻	met, leu, thy, rif-r, nal-r	Richmond, Universität Bristol
NC22-1	F ⁻	met, leu, thy, rif-r, nal-r, str-r	spontan resistente Mutante von NC22
CSH51	F ⁻	ara, pro, thi, str-r	Stammsammlung zu dem Buch "Experiments in Molecular Genetics" J. H. <u>Miller</u> , 1972.
CSH52	F ⁻	ara, pro, thi, recA, str-r	

In dieser Tabelle wurden die Abkürzungen gemäß Demerec et al (1966) verwandt.

Die Herkunft des RP4-Faktors ist in Teil I C 2 beschrieben. Der Resistenzfaktor RP4 lag uns in R.lupini vor. Ein Transfer des RP4-Faktors zwischen R.lupini und E.coli-Stämmen verläuft problemlos (s. Teil I D 7.2 oder Burkardt et al., 1975). Es war deshalb möglich, bei geeigneter Gegenselektion des Donors den RP4-Faktor in jeden gewünschten E.coli-Stamm einzuführen.

Die Herkunft und Vermehrung des PRR1-Phagens wurde in Teil I C 3 beschrieben.

III C 2 Medien und Zusätze

Als Grundmedien wurden verwendet:

PA : Penassay Broth (Difco, Detroit, USA)

LB : Luria Broth nach Jeffrey Miller (1972)

MM : Minimalmedium nach Davis und Mingioli (1950)

Diese Medien enthielten je nach Experiment folgende Zusätze:

Amp	: Ampicillin	100 µg/ml	(Höchst, Frankfurt)
Kan	: Kanamycin	25 µg/ml	(Grunenthal, Stolberg/Rheinland)
Tet	: Tetracyclin	10 µg/ml	(Höchst, Frankfurt)
Str	: Streptomycin	200 µg/ml	(Serva, Heidelberg)
Nal	: Nalidixinsäure	100 µg/ml	(Serva, Heidelberg)
Thy	: Thymin	3 µg/ml	(Serva, Heidelberg)
Met	: Methionin	20 µg/ml	(NBC, Cleveland, USA)
Leu	: Leucin	20 µg/ml	(NBC, Cleveland, USA)

III C 3 Die "interrupted mating"-Methode zur Analyse des RP4-Transfers zwischen E.coli-Stämmen

Die Elternstämme wurden bis Mitte log-Phase bei 37° C im Schüttelwasserbad angezogen. Der Kreuzungsbeginn erfolgte durch Mischen der beiden Elternstämme im Verhältnis 1 : 1. Dieses Kreuzungsgemisch wurde langsam weitergeschüttelt. Alle 15 min wurde daraus eine Probe (1 ml) entnommen, die für 2 min zur Trennung der Konjugationspartner kräftig geschüttelt wurde. Aus einer entsprechenden Verdünnungsstufe dieser so behandelten Probe erfolgte schließlich das Ausplattieren auf selektive Medien.

III C 4 RP4-Transfer zwischen E.coli-Stämmen in Flüssigmedium

Je 1 ml einer Ü-Kultur der beiden Elternstämme wurden zu 8 ml Kreuzungsmedium gegeben und über Nacht bei Zimmertemperatur gerollert. Am nächsten Morgen wurde eine Verdünnungsreihe dieser Kreuzungssuspension auf selektive Medien ausplattiert.

III C 5 Test auf Antibiotikaresistenz

Einzelkolonien der zu testenden Stämme wurden auf antibiotikahaltigen Nähragar gestempelt. Diese Platten wurden nach 24-stündiger Inkubation abgelesen. Normales Koloniewachstum zeigte die entsprechende Antibiotikaresistenz an.

III C 6 Test auf PRR1-Sensitivität

Diese Testmethode wurde in Teil I C 14 beschrieben.

III C 7 E.coli-Kreuzung auf Festmedium zur Übertragung chromosomaler Markierungen

Ü-Kulturen der beiden auxotrophen Elternstämme wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und 0,1 ml davon auf PA-Platten ausgespatelt. Diese Kreuzungsplatte wurde über Nacht bei 37° C inkubiert und das Kreuzungsgemisch am nächsten Tag mit 2 ml Puffer (NaCl 0,15 M) abgeschwemmt. Eine Verdünnungsreihe davon wurde dann auf selektive Medien ausgespatelt.

III D Ergebnisse

III D 1 Analyse des RP4-Transfers zwischen E.coli-Stämmen mit Hilfe einer "interrupted mating"-Technik: Entdeckung einer isoliert auftretenden Ampicillinresistenz

Das Transferverhalten des RP4-Faktors in E.coli wurde mittels einer "interrupted mating"-Technik analysiert. Dazu wurde das Kreuzungsgemisch CSH 51 (RP4) x NC22:nal-r bei 37° C vorsichtig im Wasserbad geschüttelt. Alle 15 min wurde eine Probe entnommen, die Kreuzungspaare durch Schütteln getrennt und eine Verdünnungsreihe davon auf selektive Medien (PA + Amp + Nal, PA + Kan + Nal, PA + Nal) ausplattiert. Nalidixinsäure (Nal) diente zur Gegenselektion des Donors. In Abb. 1 sind die Kurven für den Erwerb der amp-r, kan-r und tet-r Markierung dargestellt. Man findet, daß die ersten resistenten Rezipientenzellen nach 15 min auftreten. Außerdem fällt auf, daß die Kurve für die ampicillinresistenten Rezipienten rund 3 x so steil verläuft wie die für die kanamycin- und tetracyclinresistenten Zellen. Ein einfaches Experiment kann diesen Befund klären. Untersucht man nämlich mit Stempeltests die resistenten Rezipientenkolonien des "interrupted mating"-Experiments auf sämtliche Resistenzmarkierungen des RP4-Faktors, so ergibt sich, daß sowohl kanamycin- als auch tetracyclinresistente Kolonien jeweils das gesamte Resistenzspektrum des RP4-Faktors beinhalten, daß aber nur 11% der ampicillinresistenten Kolonien alle RP4-Resistenzen zeigen. Die restlichen 89% der ampicillinresistenten Kolonien erwiesen sich dagegen als kanamycin- und tetracyclinsensitiv. Diese Kolonien zeichnen sich also durch eine isoliert auftretende Ampicillinresistenz aus. Obwohl mit dem bis jetzt beschriebenen Experiment noch keine Aussage über den genetischen Zustand der isoliert auftretenden Ampicillinresistenz gemacht werden kann, soll in Vorwegnahme späterer Ergebnisse der RP4-1K-Faktor (K von Konjugation) eingeführt werden, der für diese

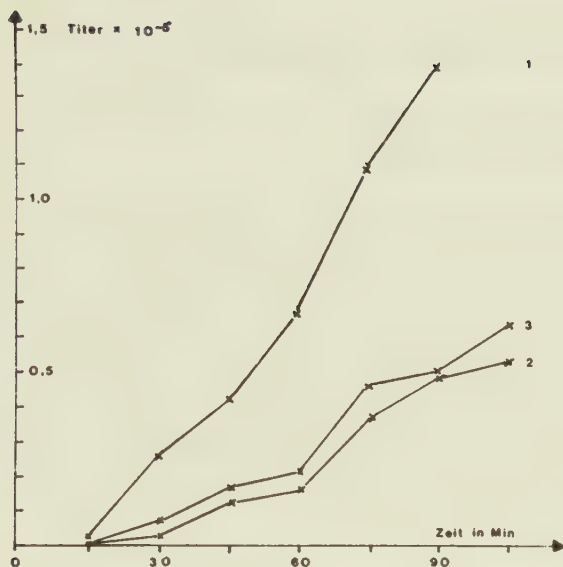


Abb. 1: Analyse des RP4-Transfers zwischen E.coli-Stämmen

Der RP4-Transfer zwischen den Stämmen CSH 51 (RP4) und NC22: nal-r wurde mit Hilfe einer "interrupted mating"-Methode analysiert. Zur Gegenselektion des Donors diente Nalidixinsäure (100µg/ml). Aufgetragen ist der Erwerb der amp-r (1), kan-r (2) und tet-r Markierung (3) durch den Rezipientenstamm in Abhängigkeit von der Kreuzungszeit.

Ampicillinresistenz codieren soll. Als Entstehungsmechanismus schlagen die im weiteren beschriebenen Experimente eine Abspaltung des RP4-1K-Faktors vom RP4-Faktor vor.

III D 2 Abspaltung des RP4-1K-Faktors in Abhängigkeit vom Kreuzungsmedium

Die Abspaltung des RP4-1K-Faktors in Abhängigkeit vom Kreuzungsmedium wurde mit der Kreuzung K 12 (RP4) x K12-1: str-r gemessen. Als Kreuzungsmedium wurde PA oder LB mit den Zusätzen CaCl_2 (0,05 M) oder MgCl_2 (0,05 M) verwendet. Die beiden Elternstämme wurden in diesen Kreuzungsmedien gemeinsam über Nacht bei Zimmertemperatur gerollert und eine Verdünnungsreihe davon auf selektive Platten (PA + Amp + Str, PA + Kan + Str, PA + Tet + Str) ausplattiert. Nach Inkubation dieser Platten konnte die Anzahl resistenter Rezipienten pro ml Kreuzungssuspension bestimmt werden (Tabelle II).

Tabelle II: RP4-Transfer zwischen den Stämmen K12 (RP4) und K12-1: str-r in Abhängigkeit vom Kreuzungsmedium

Kreuzungsmedium	Anzahl der resistenten Rezipienten pro ml Kreuzungssuspension selektiert auf		
	PA + Amp + Str	PA + Kan + Str	PA + Tet + Str
PA	$1,4 \times 10^5$	$6,4 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$
PA + CaCl_2 (0,05 M)	$3,6 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$5,1 \times 10^5$
PA + MgCl_2 (0,05 M)	$1,1 \times 10^5$	$2,8 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$
LB	$5,7 \times 10^4$	$8,7 \times 10^4$	$6,3 \times 10^4$
LB + CaCl_2 (0,05 M)	$3,1 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$
LB + MgCl_2 (0,05 M)	$1,6 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$

In diesen Kreuzungen fällt auf, daß die höchsten Transfer-
raten in Gegenwart von CaCl_2 erzielt werden. Ohne CaCl_2
oder in Gegenwart von MgCl_2 findet man auf den Ampicillin-
platten mehr resistente Kolonien als auf den Kanamycin-
oder Tetracyclinplatten. Testet man die Kolonien dieser
Antibiotikaplaten auf sämtliche RP4-Resistenzen, so ergibt
sich wiederum die schon beschriebene Aufspaltung der ampi-
cillinresistenten Kolonien. Diese Kolonien enthalten ent-
weder den RP4- oder den RP4-1K-Faktor. In Tabelle III
sind die Abspaltnungsverhältnisse dargestellt. Wie man schon
aus den Transferfrequenzen der Tabelle II ableiten kann,
ergibt sich bei Verwendung der Kreuzungsmedien PA, PA +
 MgCl_2 , LB und LB + MgCl_2 eine Abspaltnung des RP4-1K-Faktors.
 MgCl_2 verstärkt diesen Effekt jeweils erheblich, bei PA
von 20% auf 93% und bei LB von 4% auf 24%. CaCl_2 dagegen
unterdrückt die Abspaltnung des RP4-1K-Faktors vollkommen.

Tabelle III: Einfluß des Kreuzungsmediums auf die Abspaltnung des RP4-1K-Faktors beim
RP4-Transfer zwischen K12 (RP4) und K12-1: str-r

Kreuzungsmedien	Prozentsatz RP4- und RP4-1K-tragender Kolonien ^{x)}	
	RP4	RP4-1K
PA	80%	20%
PA + CaCl_2 (0,05 M)	100%	0%
PA + MgCl_2 (0,05 M)	7%	93%
LB	96%	4%
LB + CaCl_2 (0,05 M)	100%	0%
LB + MgCl_2 (0,05 M)	76%	24%

x) getestet wurden jeweils 50 Kolonien

III D 3 Der Einfluß der rec-Funktion in Donor und Rezipient auf den RP4-Transfer und die Entstehung des RP4-1K-Faktors

In diesem Abschnitt soll gezeigt werden, welchen Einfluß die rec-Funktion in Donor und Rezipient auf den RP4-Transfer nimmt. Es ist zu erwarten, daß der RP4-Faktor als extra-chromosomales Element für seinen Transfer keine rec-Funktion benötigt. Interessant ist aber, ob diese rec-Funktion einen Einfluß auf die Abspaltung des RP4-1K-Faktors ausübt.

III D 3.1 RP4-Transfer mit rekombinationsdefekten Rezipienten

Der Einfluß der rec-Funktion auf die Etablierung des RP4-Faktors im Rezipienten und auf die Abspaltung des RP4-1K-Faktors kann aus den Ergebnissen der folgenden beiden Kreuzungen abgelesen werden werden:

A: K 12 (RP4) x CSH51: $recA^+$, str-r

B: K 12 (RP4) x CSH52: $recA^-$, str-r

Die beiden Rezipienten CSH51 und CSH52 sind bis auf die rec-Funktion isogene Stämme. Beide Stämme wurden in Kreuzungen mit F'- und Hfr-Donoren auf die $recA^+$ - und $recA^-$ -Eigenschaft geprüft. Diese Testkreuzungen, die entsprechend dem Versuch Nr. 12 aus "Experiments in Molecular Genetics" (Jeffrey Miller, 1972) durchgeführt wurden, brachten das erwartete Ergebnis: F'-Faktoren konnten sich in $recA^-$ -Rezipientenzellen etablieren, während Kreuzungen zwischen Hfr-Donoren und $recA^-$ -Rezipienten nur sehr wenige prototrophe Rekombinanten lieferten.

Man findet (Tabelle IV), daß sich in den beiden Kreuzungen A und B sowohl die Anzahl der ampicillin-, der kanamycin- und der tetracyclinresistenten Rezipientenzellen nicht wesentlich unterscheidet. Ein rekombinationsdefekter Rezipient hat auf das Transferverhalten des RP4-Faktors also keinen Einfluß.

Tabelle IV: Vergleich von RP4-Kreuzungen mit recA^+ - und recA^- - Rezipienten

Kreuzung	Anzahl der resistenten Rezipienten- zellen pro ml selektioniert auf den Medien			Resistenztest von primär amp^r Kolonien: Anzahl der Kolonien mit den Resistenzen	
	PA+ Amp^r +Str	PA+ Kan^r +Str	PA+ Tet^r +Str	$\text{amp}^r, \text{kan}^r, \text{tet}^r, \text{amp}^r, \text{kan}^r, \text{tet}^r,$	
A	$3,0 \times 10^7$	$2,9 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	50	0
B	$1,4 \times 10^7$	$2,9 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	50	0

A: K12 (RP4) x CSH51: recA^+ , nal^r

B: K12 (RP4) x CSH52: recA^- , nal^r

Bemerkenswert ist für diese Kreuzungen aber, daß wesentlich mehr ampicillinresistente als kanamycin- oder tetracyclinresistente Zellen sowohl in recA^+ als auch in recA^- Rezipienten auftreten. Dies spricht für eine häufige Abspaltung des RP4-1K-Faktors. Durch einen Resistenztest von je 50 ampicillinresistenten Kolonien aus beiden Kreuzungen konnte diese Vermutung bestätigt werden. Die isoliert auftretende Ampicillinresistenz des RP4-Faktors kann sich also auch in rekombinationsdefekten Rezipienten etablieren. Damit wird die Annahme gestützt, daß sich diese Ampicillinresistenz extrachromosomal auf dem postulierten Resistenzfaktor RP4-1K befindet. Andererseits kann man ein Modell ausschließen, das eine durch die rec -Funktion vermittelte Integration der Ampicillinresistenz ins Chromosom annimmt.

III D 3.2 RP4-Transfer mit rekombinationsdefekten Donoren

Es soll noch getestet werden, ob ein rekombinationsdefekter RP4-Donor ein normales Transferverhalten zeigt. Hierzu wurden folgende Kreuzungen in Flüssigmedium durchgeführt:

C : CSH51 (RP4) : $recA^+$ x NC22 : nal-r

D : CSH52 (RP4) : $recA^-$ x NC22 : nal-r

Die verwendeten $recA^+$ - und $recA^-$ -Donorstämme wurden nach Durchführung der Kreuzungen A und B (Teil III D) isoliert. Der RP4-Faktor wurde nach NC22 : nal-r übertragen, da dieser Rezipient eine Gegenselektion des Donors mit Nalidixinsäure erlaubt. Die Ergebnisse der Kreuzungen C und D sind in Tab. V zusammengefaßt. Man findet für die Resistenzmarkierungen des RP4-Faktors insgesamt etwas verringerte Transferraten. Als Erklärung hierfür könnte die thy-Markierung des Rezipientenstammes NC22 herangezogen werden. Ansonsten zeigen beide Kreuzungen aber ein vollkommen gleiches Bild. Lediglich bei der Abspaltung des RP4-1K-Faktors ergeben sich Unterschiede. Da aber über den Abspaltungsmechanismus zu wenig bekannt ist, sollen die unterschiedlichen Prozentzahlen nicht mit der $recA$ -Funktion in Zusammenhang gebracht werden. Festgehalten werden soll jedoch, daß auch in Kreuzungen mit rekombinationsdefekten Donoren eine Abspaltung des RP4-1K-Faktors stattfindet.

III D 4 Analyse von RP4-1K-Faktoren

Aus den vorausgegangenen Versuchen ist bekannt, daß der RP4-Faktor seine Ampicillinresistenz abspaltet und daß sich diese nach Konjugationstransfer sowohl in $recA^+$ als auch in $recA^-$ Rezipienten etablieren kann. Der für diese Ampicillinresistenz postulierte RP4-1K-Faktor soll nun weiter analysiert werden. Insbesondere soll geprüft werden, ob RP4-1K-tragende Zellen von dem RP-spezifischen Phagen PRR1 lysiert werden

und ob sich RP4-1K auf andere Zellen übertragen läßt. Außerdem soll getestet werden, ob RP4-1K-tragende Zellen zum chromosomalen Gentransfer fähig sind.

Tabelle V: Vergleich von RP4-Kreuzungen mit $recA^+$ - und $recA^-$ -Donoren

Kreuzung	Anzahl der resistenten Rezipientenzellen pro ml selektioniert auf den Medien			Resistenztest von primär amp^r Kolonien: Anzahl der Kolonien mit den Resistenzen	
	PA+ Amp^r + Nal^r	PA+ Kan^r + Nal^r	PA+ Tet^r + Nal^r	amp^r, kan^r, tet^s	amp^r, kan^r, tet^r
C	$1,2 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	20	30
D	$1,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	40	10

C: CSH51 (RP4): $recA^+$ x NC22: nal^r

D: CSH52 (RP4): $recA^-$ x NC22: nal^r

III D 4.1 PRR1-Resistenz von RP4-1K-tragenden Zellen

Der RP-spezifische RNS-Phage PRR1 lysiert RP4-tragende E.coli-Stämme. Tropft man nun eine PRR1-Suspension (Titer 10^9 pfu) auf den Weichagarrasen eines RP4-1K-tragenden E.coli-Stammes, so bekommt man keinen Phagenfraß. Das gleiche Ergebnis erhält man, wenn auf einer Agarplatte der Pipettenstrich eines RP4-1K-tragenden Stammes mit einer PRR1-Suspension querge-

strichen wird. Auch hier findet man keinen Lysebereich. Diese Versuche zeigen, daß ein RP4-1K-tragender Stamm PRR1-resistent ist. Das Gen für PRR1-Sensitivität des RP4-Faktors liegt also nicht auf dem RP4-1K-Faktor.

III D 4.2 Transfer des RP4-1K-Faktors

Der Transfer des RP4-Faktors wurde mit einem "interrupted mating"-Experiment analog dem Versuch aus Teil III D 1 durchgeführt. Verwendet wurde als RP4-1K-Donor je ein $recA^+$ und $recA^-$ Stamm, von denen aus das Plasmid auf NC22 übertragen wurde. In Abb. 2 sind die Kurven für den Erwerb des RP4-1K-Faktors wiedergegeben. Man findet, daß die rec -Funktion keinen Einfluß auf den Transfer des RP4-1K-Faktors nimmt. Überraschend ist jedoch die in diesem Versuch auftretende hohe Transferrate. Nach einer Kreuzungszeit von 105 Minuten haben praktisch schon alle Rezipientenzellen den RP4-1K-Faktor erhalten. Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem "interrupted mating"-Experiment von Abb. 1, in dem ein RP4-Faktor transferiert wurde, so sieht man, daß der RP4-1K-Faktor etwa 10^3 mal häufiger übertragen wird als der dort eingesetzte RP4-Faktor.

Dieser Transfer der vom RP4-Faktor abgespaltenen Ampicillin-resistenz bestärkt erneut die Hypothese, daß es sich hierbei um einen extrachromosomalen, selbsttransmissiblen Resistenzfaktor handelt.

III D 4.3 Initiierung des chromosomalen Gentransfers durch den RP4-1K-Faktor

Die Überraschung beim Konjugationstransfer des RP4-1K-Faktors lag in der enorm hohen Transferwahrscheinlichkeit. Es war deshalb sinnvoll, zu testen, ob bei diesem Transfer auch chromosomale Markierungen transferiert werden. Zu diesem Zweck wurden folgende Kreuzungen auf Festmedien durchgeführt:

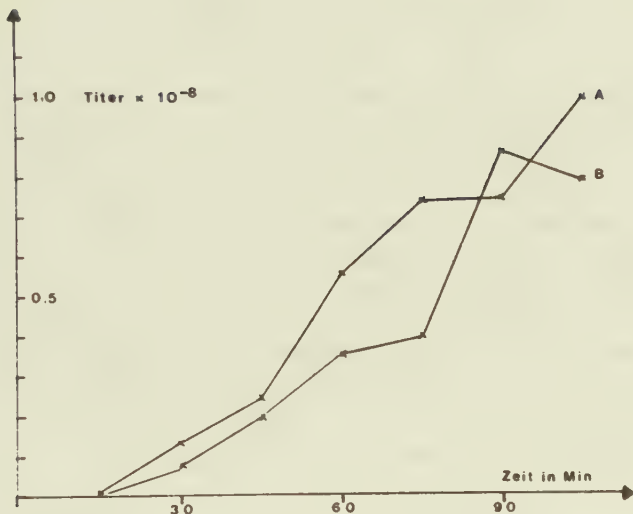


Abb. 2: Analyse des RP4-1K-Transfers in Abhängigkeit von der *recA*-Funktion des Donors

Der RP4-1K-Transfer wurde mit Hilfe einer "interrupted mating"-Methode für folgende Kreuzungen gemessen:

(A) : CSH51 (RP4-1K): *recA*⁺ x NC22: *nal*-r

(B) : CSH52 (RP4-1K): *recA*⁻ x NC22: *nal*-r

Zur Gegenselektionierung des Donors diente Nalidixinsäure (100 µg/ml). Aufgetragen ist der Erwerb des *amp*-r Markierung durch den Rezipientenstamm in Abhängigkeit von der Kreuzungszeit.

CSH51 (RP4-1K) x NC22 : met, leu, thy, nal-r
 CSH51 (RP4) x NC22 : met, leu, thy, nal-r

Die Verwendung eines RP4-1K- und RP4-tragenden Donorstammes hatte als Ziel, die beiden R-Faktoren in ihrer Fähigkeit zu vergleichen, in wie weit sie zur Initiierung von chromosomalem Gentransfer in der Lage sind. Folgende Kreuzungsmethode wurde angewandt: Beide Elternstämme wurden über Nacht gemeinsam auf PA-Platten angezogen. Am nächsten Morgen wurde das Kreuzungsgemisch geerntet und auf selektive Platten ausgespatelt. Die Verwendung speziell supplementierter Minimalplatten selektionierte für die einzelnen Markierungen leu^+ und met^+ und für die Kombination leu^+, met^+ . Zur Gegenselektion diente wiederum Nalidixinsäure. In Tabelle VI sind die Ergebnisse dieser Kreuzung aufgeführt.

Tabelle VI: RP4-1K initiiertes chromosomales Gentransfer in Escherichia coli

Kreuzung	Anzahl der Rekombinanten pro 0,2 ml Kreuzungssuspension selektiert für die Markierungen		
	leu^+ a)	met^+ b)	leu^+, met^+ c)
CSH51 (RP4-1K) x NC22	100	42	2
CSH51 (RP4) x NC22	0	0	0

Kontrollen: Die analog durchgezogenen Kontrollen der Elternstämme erwiesen sich bis auf eine Rückmutante als absolut stabil.

- a) selektives Medium: MM + Thy + Nal + Met
- b) selektives Medium: MM + Thy + Nal + Leu
- c) selektives Medium: MM + Thy + Nal

Für die selektionierten Markierungen leu^+ und met^+ findet man in der Kreuzung mit CSH 51 (RP4-1K) als Donor Rekombinanzzahlen, die deutlich für einen chromosomalen Transfer sprechen. Analoge Ergebnisse konnten mit CSH 51 (RP4) nicht erzielt werden. Hier wirkt sich anscheinend der um 3 Zehnerpotenzen geringere Transfer des RP4-Faktors aus. Die in der Kreuzung mit dem RP4-1K-Faktor aufgefundenen Rekombinanten wurden nochmals auf ihre Auxotrophie- und Resistenzmarkierungen getestet (Tabelle VII). Dabei zeigte sich, daß in einigen der leu^+ und met^+ Rekombinanten auch jeweils die nichtselektionierte Markierung vorhanden war. In einigen wenigen Rekombinanten konnte auch die Ampicillinresistenz gefunden werden. Man kann daraus schließen, daß beim Transfer von chromosomalen Markierungen nur selten die gesamte Information des RP4-1K-Faktors übertragen wird.

Tabelle VII: Auxotrophie- und Resistenztest von Rekombinanten aus der Kreuzung CSH51 (RP4-1K) x NC22

Anzahl der getesteten Rekombinanten mit der primär selektionierten Markierung	Anzahl der Rekombinanten mit den Markierungen			
	leu^+ , met^+ a)	leu^+ b)	met^+ c)	amp-r d)
52 (leu^+)	6	52	6	5
56 (met^+)	3	5	56	5
2 (leu^+ , met^+)	2	2	2	2

a) Stempeltest auf MM + Thy + NaI

b) Stempeltest auf MM + Thy + NaI + Met

c) Stempeltest auf MM + Thy + NaI + Leu

d) Stempeltest auf MM + Thy + NaI + Amp

Mit diesen Versuchen ist gezeigt, daß der RP4-1K-Faktor zur Initiierung von chromosomalem Gentransfer in E.coli geeignet ist.

III E 1 Extrachromosomale Natur der isoliert auftretenden Ampicillinresistenz

Mit den vorliegenden Experimenten wurde eine isoliert auftretende Ampicillinresistenz beschrieben, die nach Konjugationsexperimenten mit dem RP4-Faktor selektioniert werden konnte. Die folgenden Beobachtungen zeigen, daß es sich bei dieser isoliert auftretenden Antibiotikaresistenz um einen Resistenzfaktor, RP4-1K genannt, handelt:

- 1) RP4-1K ist selbst transmissibel. In Konjugationsversuchen (Abb. 2) erwerben Rezipientenzellen innerhalb kürzester Zeit die Ampicillinresistenz.
- 2) RP4-1K kann sich auch in recA-Stämmen etablieren (Abbildung 2). Eine normale chromosomale Rekombination ist in solchen Stämmen ausgeschlossen. Extrachromosomale Elemente können aber von recA-Stämmen aufgenommen werden.
- 3) RP4-1K kann -wenn auch nur mit geringer Rate- chromosomalen Gentransfer in E.coli induzieren (Tabelle V).

Der RP4-1K-Faktor trägt also zumindest die beschriebene Ampicillinresistenz sowie die Information für seinen eigenen Transfer

III E 2 Verwandtschaft zwischen dem RP4- und dem RP4-1K-Faktor

Aus den dargestellten Versuchen ist zu ersehen, daß der RP4-1K-Faktor beim Transfer des RP4-Faktors auftritt. Interessant ist nun die Frage, in wie weit diese beiden R-Faktoren miteinander verwandt sind. Vergleicht man die beiden Transfersysteme des RP4- und des RP4-1K-Faktors, so findet man folgende Unterschiede:

- 1) Der RP4-1K-Faktor wird bis zu einem Faktor 10^3 häufiger übertragen als der RP4-Faktor.
- 2) Eine RP4-tragende E.coli-Zelle wird von dem RNS-Phagen PRR1 lysiert, eine RP4-1K-tragende Zelle dagegen nicht. Nimmt man an, daß als Adsorptionsstelle für den PRR1-Phagen der RP-spezifische Pilus dient (Bradley, 1974), so müßten die Transfersysteme von RP4 und RP4-1K unterschiedliche Pili besitzen.

Diese beiden Punkte würden also für unterschiedliche Transfersysteme und damit für unterschiedliche R-Faktoren sprechen. Außerdem soll noch ein Ergebnis aus Teil V dieser Arbeit herangezogen werden. Dort wird gezeigt, daß RP4-1K und eine amp^s Mutante des RP4-Faktors kompatibel sind. Dies bedeutet, daß beide R-Faktoren zu unterschiedlichen Kompatibilitätsklassen gehören. Eine Verwandtschaft zwischen diesen beiden R-Faktoren ist nach diesem Kriterium also ausgeschlossen.

III E 3 Herkunft und Entstehung des RP4-1K-Faktors

Für die Herkunft und Entstehung des RP4-1K-Faktors können mehrere Modelle angenommen werden. Die wichtigsten sollen hier kurz diskutiert werden.

Das Modell der unabhängigen Plasmide:

RP4 und RP4-1K liegen unabhängig voneinander in der E.coli-Zelle vor. Durch Konjugationstransfer kann der RP4-1K-Faktor vom RP4-Faktor getrennt werden.

Das Abspaltungsmodell:

Der RP4-1K-Faktor ist im RP4-Faktor enthalten. Er kann jedoch vom RP4-Faktor abgespalten werden. Durch Konjugationstransfer wird dann der RP4-1K-Faktor selektioniert.

Das Konjugationsmodell:

Der RP4-1K-Faktor entsteht nach unvollständigem Transfer des RP4-Faktors im Rezipienten.

Diese Modelle sollen gegeneinander abgewogen werden. Für das Modell der unabhängigen Plasmide spricht, daß der RP4- und der RP4-1K-Faktor zu unterschiedlichen Kompatibilitätsgruppen gehören. Andererseits ist es aber unerklärlich, wie diese Plasmide die lange Wandschaft von P.aeruginosa nach E.coli, von da aus nach R.lupini und wieder zurück nach E.coli gemeinsam überstanden haben, ohne getrennt zu werden. Noch eine Beobachtung spricht gegen zwei unabhängige Resistenzfaktoren. Würden diese beiden R-Faktoren RP4 (amp-r, kan-r, tet-r) und RP4-1K (amp-r) gemeinsam in einer Zelle existieren, so würde das Gen für die Ampicillinresistenz doppelt vorliegen. Damit wäre aber praktisch jede Möglichkeit ausgeschlossen, aus solchen Zellen ampicillinsensitive Mutanten zu isolieren. In Wirklichkeit konnten aber in R.lupini (Teil I) und in E.coli (Teil V) ohne größere Schwierigkeiten solche ampicillinsensitive RP4-Mutanten isoliert werden. Diese Beobachtungen widersprechen der Annahme von unabhängigen RP4- und RP4-1K-Faktoren.

Das Abspaltungsmodell erklärt die enge Kopplung zwischen dem RP4- und RP4-1K-Faktor. Interessant ist dabei die Art der Abspaltung. In dem geschilderten Konjugationsexperiment traten entweder der gesamte RP4- oder der RP4-1K-Faktor auf. Es konnte aber kein Plasmid gefunden werden, das Gene des RP4-Faktors trägt, die nicht auf dem RP4-1K-Faktor liegen. Daraus kann man folgern, daß der RP4-Faktor nicht einfach aus zwei fusionierten Plasmiden besteht, die wieder desintegrieren können. Vielmehr scheint der RP4-Faktor den RP4-1K-Faktor abzuspalten, der dann nach einem bevorzugten Transfer im Rezipienten nachgewiesen werden kann.

Das Konjugationsmodell hat den Vorteil, daß es die Entstehung des RP4-1K-Faktors mit dem Konjugationsvorgang verbindet. Liegt nach unvollständigem Transfer des RP4-Faktors die gesamte Information des RP4-1K-Faktors im Rezipienten vor, so kann durch Zyklisierung der RP4-1K-Faktor ausgebildet werden.

Nach dieser Darstellung sind Abspaltungs- und Konjugationsmodell gleich wahrscheinlich. Berücksichtigt man aber noch die Transduktionsergebnisse des RP4-Faktors (Teil V dieser Arbeit) die ebenfalls eine Abspaltung der Ampicillinresistenz vom RP4-Faktor nachweisen, so muß man dem "Abspaltungsmodell" den Vorrang geben.

III E 4 Einfluß der Kreuzungsmedien auf die Abspaltung des RP4-1K-Faktors

Durch Verwendung von Ca^{++} - oder Mg^{++} -haltiger Kreuzungsmedien konnte die Abspaltung des RP4-1K-Faktors wesentlich beeinflußt werden. Mg^{++} -Ionen (0,05 M) steigerten die RP4-1K-Abspaltung während Ca^{++} -Ionen (0,05 M) diese Abspaltung unterdrückten. Für die Wirkungsweise dieser Ionen kann man je nach Entstehungsmechanismus des RP4-1K-Faktors folgende Modelle annehmen:

- Ca^{++} -Ionen verhindern die Abspaltung des RP4-1K-Faktors vom RP4-Faktor, die andererseits durch Mg^{++} -Ionen induziert wird. Hier könnten spezifische, Mg^{++} -abhängige Nukleasen im Spiele sein.
- Eine andere Möglichkeit ergibt sich aus dem Transfer des RP4- und des RP4-1K-Faktors. Ca^{++} -Ionen könnten den Transfer des RP4-1K-Faktors vom Donor zum Rezipienten behindern, während er in Gegenwart von Mg^{++} -Ionen bevorzugt durchgeführt wird.

- Aber auch ein angenommener unvollkommener Transfer des RP4-Faktors könnte durch Ca^{++} - oder Mg^{++} -Ionen beeinflusst werden. Ca^{++} -Ionen könnten z. B. einen solchen Transfer stabilisieren.

Zur Zeit wissen wir über die Wirkungsweise der Ca^{++} - oder Mg^{++} -Ionen bei der RP4-1K-Ausbildung noch nichts Genaueres. Dieser Effekt bedarf also weiterer Analysen.

III E 5 Der Einfluß der rec-Funktion in Donor und Rezipient auf den RP4-Transfer und die RP4-1K-Abspaltung

Durch Verwendung von rekombinationsdefekten Donor- und Rezipientenstämmen konnte gezeigt werden, daß

- 1.) der RP4-Transfer in Donor und Rezipient nicht von dem Rekombinationssystem der Zelle abhängt und daß
- 2.) auch die RP4-1K-Abspaltung weder in Donor noch Rezipient einen zellulären Rekombinationsmechanismus benötigt.

Für die RP4-1K-Abspaltung kann man daraus folgern, daß diese durch ein RP4-codiertes Enzymsystem erfolgt. Über die an diesem Abspaltungsmechanismus beteiligten Enzyme ist aber weiteres nicht bekannt. Lediglich der Ca^{++} - und Mg^{++} -Effekt bei der RP4-1K-Abspaltung kann -wie beschrieben- mit diesen Enzymen in Zusammenhang gebracht werden.

III E 6 Charakterisierung des RP4-1K-Faktors

Für den RP4-1K-Faktor wurde gezeigt, daß er eine Ampicillin-resistenz und eine RTF-Einheit besitzt. Diese RTF-Einheit ist bis um den Faktor 10^3 effektiver als die des RP4-Faktors. Dies wurde in "interrupted mating"-Experimenten mit $recA^+$ und $recA^-$ Stämmen nachgewiesen. Aufgrund der hohen Transfer-wahrscheinlichkeit ist auch verständlich, daß der RP4-1K-Faktor in E.coli zu einem geringen chromosomalen Gentransfer in der Lage ist. Das Experiment der Tabelle VII zeigt übrigens, daß durch den RP4-1K-Faktor in einigen Fällen auch ein größerer Chromosomenabschnitt übertragen wurde, nämlich ein DNA-Fragment, das die Gene für Methionin und Leucin trug. Dieser Befund geht konform mit der allgemeinen Vorstellung, die sich im Laufe der Zeit von der Mobilisierung des chromosomalen Transfers durch extrachromosomale Fertilitätsfaktoren entwickelt hat. Demnach kann der RP4-1K-Faktor in vereinzelten Fällen an das E.coli-Chromosom angekoppelt werden und ist dann in der Lage, einen größeren Abschnitt des E.coli-Chromosoms zu übertragen.

III E 7 Das RP4-1K-Problem aus der Sicht anderer Autoren

Einen wesentlichen Beitrag zu dem in dieser Arbeit angeschnittenen RP4-1K-Problem lieferten Chandler und Krishnapillai (1974). Diese Autoren untersuchten die extrachromosomal-codierte Antibiotikaresistenz des P.aeruginosa Stammes 1822, der Resistenzen gegen Carbenicillin (CB-r), Neomycin (NM-r) und Tetracyclin (TC-r) aufweist.

Da der in dieser Arbeit beschriebene RP4-Faktor auch aus P.aeruginosa 1822 stammt, kann man annehmen, daß Chandler und Krishnapillai einen dem RP4-Faktor analogen Resistenzfaktor bearbeiteten. Zu beachten ist nur noch, daß zum Test der entsprechenden Resistenzgene in E.coli an Stelle von Carbenicillin Ampicillin und an Stelle von Neomycin Kanamycin (Datta et al. 1971) verwendet wird.

Die von Chandler und Krishnapillai in P.aeruginosa durchgeführten Experimente brachten Ergebnisse, die in vielerlei Hinsicht mit den in dieser Arbeit beschriebenen Resultaten übereinstimmen:

- 1.) P.aeruginosa 1822 transferiert eine Dreifachresistenz (CB-r, NM-r, TC-r) oder eine Einfachresistenz (CB-r). Der Dreifachresistenz wird der R-Faktor R18, der Einfachresistenz der R-Faktor R18-1 zugeordnet.
- 2.) R18 und R18-1 können sich in recA-Stämmen von P.aeruginosa etablieren.
- 3.) R18-1 wird innerhalb von P.aeruginosa mit sehr hoher Frequenz übertragen. R18-1 wird als dereprimierter R-Faktor betrachtet.
- 4.) R18 wird von PRR1 lysiert, R18-1 aber nicht.

Abweichende Ergebnisse werden von Chandler und Krishnapillai allerdings beim Transfer von R18-1 nach E.coli berichtet:

- 1.) R18-1 ist in E.coli instabil.
- 2.) R18-1 benötigt zur Etablierung in E.coli die recA-Funktion.
- 3.) Stabile R18-1-Faktoren (R18-1* genannt) liegen in E.coli wahrscheinlich chromosomal integriert vor.

Dieses abweichende Verhalten des R18-1-Faktors in E.coli gegenüber dem RP4-1K-Faktor kann darauf zurückgeführt werden, daß R18-1 im Gegensatz zu RP4-1K in P.aeruginosa isoliert und erst dann nach E.coli transferiert wurde. R18-1 scheint also einen auf P.aeruginosa abgestimmten Wirtsbereich zu besitzen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Ergebnisse von Chandler und Krishnapillai decken sich in wesentlichen Punkten.

Unterschiedliche Schlüsse wurden nur bei der Diskussion über Herkunft und Entstehung der R-Faktoren RP4-1K und R18-1 gezogen. Während Chandler und Krishnapillai das Modell der unabhängigen Plasmide bevorzugen, also zwei von Anfang an unabhängige Plasmide postulieren, wurde in dieser Arbeit die Betonung auf das Abspaltungsmodell gelegt. Eine eindeutige Entscheidung zwischen diesen beiden Modellen kann aber erst nach molekulargenetischen Experimenten getroffen werden.

Analoge Untersuchungen wie Chandler und Krishnapillai führten Ingram et al. (1972) durch. Sie arbeiteten auch mit dem Stamm P.aeruginosa 1822, dessen Resistenzfaktor sie RP1 nannten. RP1 wäre also identisch mit RP4 und R18. Ingram et al. (1972) konnten nun von dem Stamm 1822 Kolonien isolieren, die die Resistenzen gegen Neomycin/Kanamycin und Tetracyclin verloren hatten, aber gegen Carbenicillin noch resistent waren. Dieser Carbenicillinresistenz ordneten sie den Resistenzfaktor RP1-1 zu, der ebenfalls mit hoher Frequenz innerhalb von P.aeruginosa transferiert werden konnte. Der RP1-1 Transfer von P.aeruginosa nach E.coli dagegen erfolgte nur mit sehr verminderter Frequenz. Außerdem zeigte RP1-1 in E.coli ein instabiles Verhalten. Nach Subkultivierung konnten allerdings stabile RP1-1-tragende E.coli-Kolonien isoliert werden, die jedoch zu keinem Transfer des RP1-1-Faktors in E.coli fähig waren. Diese stabilen RP1-1-Faktoren wurden mit RP1-1⁺ bezeichnet. Sie liegen wahrscheinlich integriert im E.coli-Chromosom vor (Richmond und Sykes, 1972). Die angeführten Ergebnisse von Ingram et al. (1972) stimmen mit denen von Chandler und Krishnapillai (1974) überein: Die Carbenicillinresistenz der R-Faktoren RP1-1 und R18-1 aus P.aeruginosa läßt sich nur sehr schwer nach E.coli übertragen und liegt dort instabil vor, anders als die Ampicillinresistenz des R-Faktors RP4-1K, der in E.coli isoliert wurde.

Zu erwähnen bleibt noch, daß von den Autoren Panopoulos et al. (1975) die R-Faktoren R18-1 und R91-1 (ebenfalls ein R-Faktor aus P.aeruginosa mit einer alleinigen Carbenicillinresistenz) nach pflanzenpathogenen Pseudomonas-Arten transferiert wurden. Auch Cho et al. (1975) übertrugen R18-1 nach pflanzenpathogenen Erwinia-Arten. Beide Autorengruppen lieferten aber im wesentlichen keine neuen Erkenntnisse über Herkunft und Entstehung der von ihnen verwendeten R-Faktoren.

III E 8 Die molekulare Gestalt des RP4-1K-Faktors

Aus der bisherigen Diskussion geht hervor, daß molekular-genetische Untersuchungen am RP4-1K-Faktor unbedingt erforderlich sind, um

- 1.) seine Existenz als R-Faktor endgültig zu beweisen,
- 2.) seine Verwandtschaft mit dem RP4-Faktor zu überprüfen und
- 3.) zwischen dem Modell der unabhängigen Plasmide und dem Abspaltungsmodell zu unterscheiden.

Untersuchungen in dieser Richtung lieferten bis jetzt keine eindeutigen Ergebnisse und wurden deshalb im Ergebnisteil nicht dargestellt. So konnten aus RP4-1K-haltigen Stämmen in EthBr- CsCl-Gradienten keine CCC-Form des RP4-1K-Plasmids gewonnen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß RP4-1K nur in der OC-Form auftritt. Wir untersuchten deshalb die DNA aus RP4-1K-haltigen Stämmen in CsCl-Gradienten mit der analytischen Ultrazentrifuge. Der RP4-Faktor mit einer Dichte von 1.719 g/cm^3 (Grinstead et al. 1972) bandiert deutlich abgetrennt von der E.coli DNA mit einer Dichte von 1.71 g/cm^3 . Der RP4-1K-Faktor dagegen liefert keine Satellitenbande. Als Erklärung könnte man annehmen, daß RP4-1K eine dem E.coli-Chromosom analoge Dichte besitzt und deshalb nicht abgetrennt wird. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Ingram et al.

(1972) an RP1-1⁺ überein. Auch sie konnten mit analogen Methoden das DNA-Molekül des RP1-1⁺-Faktors nicht entdecken und schlossen daraus auf eine chromosomale Integration des RP1-1⁺-Faktors. Über die molekulare Gestalt des RP4-1K-Faktors ist also so gut wie nichts bekannt. Es fehlt die Information über Form, Länge und Dichte der DNA, Größen, die zur Beantwortung der Fragen benötigt werden, die sich aus den genetischen Versuchen ergeben haben. Im weiteren weist die Hartnäckigkeit, mit der sich RP4-1K einer molekularen Charakterisierung entzieht, auf einen unüblichen Resistenzfaktor hin. Man kann fast erwarten, daß sich RP4-1K als interessantes DNA-Element entpuppt, für das u. U. die Terminologie "Resistenzfaktor" nur noch bedingt zutrifft.

Teil IV :

Transposition einer transferierbaren Ampicillin-
resistenz vom RP4-Faktor auf das Genom des
P1-Phagen in Escherichia coli

IV	Transposition einer transferierbaren Ampicillinresistenz vom RP4-Faktor auf das Genom des P1-Phagen in <u>Escherichia coli</u>	117
IV A	<u>Zusammenfassung</u>	120
IV B	<u>Einleitung</u>	121
IV C	<u>Material und Methoden</u>	122
IV D	<u>Ergebnisse</u>	128
IV D 1	P1-Transduktion des RP4-Faktors	128
IV D 1.1	Vorarbeiten zur P1-Transduktion des RP4-Faktors	128
IV D 1.2	P1-Transduktion des RP4-Faktors mit verschiedenen Multiplizitäten	128
IV D 1.3	Analyse von ampicillin- und tetracyclinresistenten Transduktantenkolonien	130
IV D 2	Test des RP4-1T-Faktors auf P1-Markierungen	132
IV D 2.1	Nachweis des ts-Repressors und der P1-Phagenvermehrung in RP4-1T-tragenden Stämmen	133
IV D 2.2	Nachweis des amp-r Gens auf dem P1CMts-Genom in RP4-1T-tragenden Stämmen	135
IV D 2.3	Nachweis des Restriktionssystems des P1-Phagen in RP4-1T-tragenden Stämmen	135
IV D 2.4	Test des RP4-1T-Faktors auf RP4-Eigenschaften	136
IV E	<u>Diskussion</u>	140
IV E 1	Transduktion des RP4-Faktors mit dem P1-Phagen	140

IV E 2	Der RP4-1T-Faktor, ein intaktes P1CMts-Genom mit einem zusätzlichen amp-r Gen	140
IV E 3	Die RP4-1T-Entstehung nach der Transposon-Theorie	141
IV E 4	Welche Verwandtschaft besteht zwischen den Faktoren RP4-1K und RP4-1T?	143
IV E 5	Die Transferierbarkeit des Ampicillin- transposons durch einen "konjugations- ähnlichen" Vorgang	145
IV E 6	Überlegungen zur RP4-1K-Entstehung	146

Nach Transduktion des RP4-Faktors mit dem P1-Phagen können zwei Klassen von Transduktanten isoliert werden. Die eine Klasse trägt den RP4-Faktor, die andere den RP4-1T-Faktor. Beim RP4-1T-Faktor handelt es sich um die Ampicillin-resistenz des RP4-Faktors, die gekoppelt mit dem P1-Genom auftritt. Zur Entstehung des RP4-1-T-Faktors wird ein Wechsel der Ampicillinresistenz vom RP4-Faktor zum P1-Prophagengenom angenommen. Diese auf dem P1-Genom liegende Ampicillinresistenz kann sich wieder verselbständigen und durch einen "konjugationsähnlichen" Vorgang auf Rezipientenstämmen übergehen.

Nachdem Konjugationsexperimente mit dem RP4-Faktor in E.coli die Entstehung eines RP4-1K-Faktors gezeigt haben (Teil III), sollte mit Hilfe der P1-Transduktion geprüft werden, ob in einer Donorzelle neben dem RP4-Faktor der RP4-1K-Faktor als unabhängiger Resistenzfaktor vorliegt. Beim Reifen der P1-Phagen kann dieser anstelle des P1-Genoms auch zelluläre DNA, z. B. episomale DNA, einpacken. Liegen nun zwei unabhängige Resistenzfaktoren in einer Zelle vor, so können diese durch ein P1-Transduktions-experiment getrennt werden. Die vorliegenden Versuche zeigen, daß neben dem RP4-Faktor auch eine alleinige Ampicillinresistenz transduziert wird. Die nähere Analyse erbringt aber, daß es sich nicht um den RP4-1K-Faktor, sondern um ein Hybridplasmid handelt, das wahrscheinlich durch ein Rekombinationsereignis zwischen dem extrachromosomal vorliegenden P1-Genom und der Ampicillinresistenz des RP4-Faktors entstanden ist.

IV C Material und Methoden

IV C 1 Bakterienstämme

Die in diesem Teil der Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle I zusammengefaßt. Ihre genetischen Markierungen und ihre Herkunft sind dort angegeben.

IV C 2 Bakteriophagen

Folgende Bakteriophagen fanden Verwendung:

λ -vir:

Bei diesem Phagen handelt es sich um eine λ -Mutante, die einen defekten Operator besitzt, an dem der c_I -Repressor nicht mehr binden kann (Jacob und Monod, 1961).

Tabelle I: Bakterienstämme

Bezeichnung	genetische Markierung ^{a)}	Herkunft
E.coli K12	F ⁻ , prt,	R.Schmitt, Regensburg
E.coli K12-1	F ⁻ , prt, str-r	Spontanmutante von K12
E.coli NC22	F ⁻ , met, leu, thy, rif-r, nal-r	M.H.Richmond, Bristol, England
E.coli AT3293 (P10Hts)	pdx	L.Taylor, Denver, Colo., USA
Shigella	prt	L.Taylor, Denver, Colo., USA
R.lupini 1-20 (RP4)	Fc ⁻ Fd ⁺ , his, car-	(siehe Teil I C 1)

^{a)} Die Abkürzungen der genetischen Markierungen wurden entsprechend Demerec et al. (1966) gewählt.

λ -vir kann deshalb nicht mehr in den Prophagenzustand übergehen, kann sich aber andererseits in λ -lysogenen E.coli-Stämmen, z. B. K12 (λ), vermehren. Diese λ -vir-Mutante stammt aus dem Labor von Prof. Schmitt (Universität Regensburg). Die Vermehrung des λ -vir Phagen erfolgte mittels Plattenlysats. Dazu wurden 0,1 ml einer Ü-Kultur von E.coli K12 und 0,1 ml eines λ -vir Lysates gemeinsam mit 2 ml LB-Ca-Weichagar auf LB-Ca-Platten ausgegossen, bei 37°C über Nacht bebrütet, am nächsten Tag mit 2 ml Phagenpuffer PBS abgeschwemmt, zur Sterilisation mit einigen Tropfen Chloroform versehen und niedertourig abzentrifugiert. Der Überstand enthält meist bis zu 10^{10} pfu.

P1CMts:

Bei P1CMts handelt es sich um einen P1-Phagen, der einen temperatursensitiven Repressor (ts-Repressor) besitzt (Rosner, 1972) und außerdem auf dem Phagen genom noch eine Chloramphenicolresistenz trägt (Kondo und Mitsuhashi, 1964). Der ts-Repressor erlaubt eine Temperaturinduktion von P1-lysogenen Stämmen. Die Chloramphenicolresistenz (cam-r oder CM) ermöglicht es, über einen einfachen Resistenztest P1-lysogene Zellen zu erkennen. Den Stamm AT 3293 mit dem P1CMts Prophagen erhielten wir von Larry Taylor (Denver, USA).

PRR1:

Herkunft und Vermehrung des RP-spezifischen RNA-Phagen PRR1 wurden in Abschnitt I C 3 beschrieben.

IV C 3 Der RP4-Faktor

Die Herkunft des RP4-Faktors kann dem Abschnitt I C 2 entnommen werden. Der Transfer des RP4-Faktors von 1-20 (RP4) nach K12-1: str-r erfolgte gemäß der Vorschrift aus Abschnitt I C 8.

IV C 4 Medien und Zusätze

Als Grundmedien wurden verwendet:

PA : Penassay Broth (Difco, Detroit, USA)

LB : Luria Broth (Miller, 1972)

LBCa-Weichagar:

1 l LB-Medium und 6 g Agar werden gemeinsam autoklaviert.
Anschließend werden 10 ml einer 0,5 M CaCl_2 -Lösung und
5 ml einer 20%igen Glukoselösung dazugegeben.

LBCa-Platten:

1 l LB-Medium und 10 g Agar werden gemeinsam autoklaviert.
Vor dem Gießen werden 4 ml einer 0,5 M CaCl_2 -Lösung und
5 ml einer 20%igen Glukoselösung dazugegeben.

LB-Platten:

1 l LB-Medium und 15 g Agar werden gemeinsam autoklaviert.

Zusätze zu den Grundmedien:

Ampicillin (Amp)	100 $\mu\text{g/ml}$ (Höchst, Frankfurt)
Kanamycin (Kan)	25 $\mu\text{g/ml}$ (Grunenthal, Stolberg)
Tetracyclin (Tet)	10 $\mu\text{g/ml}$ (Höchst, Frankfurt)
Chloramphenicol (Cam)	100 $\mu\text{g/ml}$ (Boehringer, Mannheim)

Puffer:

PBS: 0,07 M NaCl, 0,02 MH_2PO_4 , 0,04 M Na_2HPO_4 , pH = 6,8

IV C 5 Gewinnung eines PICMts-Lysates

Eine Einzelkolonie eines PICMts-lysogenen E.coli-Stammes wird in einem Blubberröhrchen bei 32°C in 5 ml LB mit einem Zusatz von 0,01 M MgCl_2 bis zu einem Titer von 2×10^8 Zellen /ml kultiviert. Anschließend erfolgt die Temperatur-induktion der P1-Vermehrung durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C für 30 min. Nach weiteren 45 bis 60 min bei 37°C

ist die Phagenreifung abgeschlossen. Die Bakteriensuspension hellt sich aufgrund der Zellyse auf. Dem Lysat werden 3 Tropfen Chloroform zur Sterilisation zugesetzt. Nach niedertourigem Abzentrifugieren der Zellfragmente (15 000 U/min, 10 min) wird der Überstand nochmals mit 3 Tropfen Chloroform versetzt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

IV C 6 Titerung eines P1CMts-Lysats

Als Indikatorrasen für den P1CMts-Phagen wird Shigella verwandt. Folgende Methode wird zur Titerung benützt: 2 ml LBCa-Weichagar (50°C) wird mit 0,05 ml einer dicht gewachsenen Shigella-Kultur und 0,1 ml Phagensuspension versetzt und auf eine möglichst frische LBCa-Platte ausgegossen. Nach Verfestigung des Weichagars erfolgt die Bebrütung bei 37°C.

IV C 7 Transduktion von E.coli mit dem P1CMts-Phagen

Der E.coli-Rezipientenstamm wird bis zu einem Titer von 2×10^8 Zellen/ml kultiviert. Das P1-Lysat wird mit LB-Medium auf 5×10^9 pfu/ml verdünnt und mit $MgCl_2$ auf 0,01 M eingestellt. Folgende Mischungen werden für 30 min bei 32°C im Wasserbad behandelt:

Transduktionsansatz:

Kontrollansatz:

2,5 ml Bakterienkultur

2,5 ml Bakterienkultur

2,5 ml P1CMts-Lysat

2,5 ml LB

0,025 ml $CaCl_2$ (1M)

0,025 ml $CaCl_2$ (1M)

Anschließend erfolgt eine Zellkonzentrierung der beiden Ansätze durch niedertourige Zentrifugation (10 000 U/min, 10 min) und Aufnahme des Zentrifugats in jeweils 1 ml PBS. Das Transduktions- und Kontrollgemisch wird dann auf selektive Platten ausgespatelt.

IV C 8 Lysogenisierung eines E.coli-Stammes
mit dem P1CMts-Phagen

Eine Einzelkolonie des zu lysogenisierenden E.coli-Stammes wird bis zu einem Titer von 2×10^8 Zellen/ml kultiviert. Folgende Mischung wird anschließend bei 32°C für 30 min im Wasserbad behandelt:

1	ml P1CMts-Lysat (10^8 pfu)
1	ml Bakterienkultur
0,01	ml CaCl_2 (1M)

Das so behandelte Gemisch wird dann auf LB + Cam-Platten ausgespatelt und bei 32°C bebrütet. P1CMts-lysogene Stämme können aufgrund ihrer Chloramphenicol-Resistenz auf LB + Cam-Platten erkannt werden.

IV C 9 Antibiotikaresistenztest von Einzelkolonien

Die zu untersuchenden Einzelkolonien werden auf PA-Platten gezogen und anschließend auf antibiotikahaltige Platten überstempelt.

IV C 10 Die "interrupted mating"-Methode zur Analyse
des RP4-1T-Transfers zwischen E.coli-Stämmen

Diese Methode ist ausführlich in III C 3 beschrieben. Lediglich die Anzucht der Ausgangsstämme, die eigentliche Kreuzung und das Bebrüten der selektiven Platten erfolgte aufgrund des temperatursensitiven Repressors des P1CMts-Phagen bei 30°C .

IV C 11 Transferexperiment einer Ampicillinresistenz
auf Festmedium

Die Ü-Kulturen der Elternstämme werden im Verhältnis 1 : 1 gemischt, davon 0,1 ml auf PA-Platten ausgespatelt und diese Platten über Nacht bei 30°C bebrütet. Das Kreuzungsgemisch

wird durch Abschwemmen der Platten mit 2 ml Puffer geerntet und eine entsprechende Verdünnungsreihe davon auf selektive Medien ausgespatelt.

IV D Ergebnisse

IV D 1 P1-Transduktion des RP4-Faktors

IV D 1.1 Vorarbeiten zur P1-Transduktion des RP4-Faktors

Verwendung fand ein P1CMts-Phage, der neben einem temperatur-sensitiven Repressor noch eine Chloramphenicolresistenz besaß. Diese beiden Eigenschaften erleichterten das Arbeiten mit dem P1-Phagen, da man erstens eine P1-lysogene E.coli-Zelle an ihrer Chloramphenicolresistenz erkennen und zweitens die P1-Vermehrung in einer solchen Zelle durch einen einfachen Temperatursprung von 32°C auf 42°C induzieren kann.

Als Ausgangsstamm für dieses Experiment wurde der Stamm K12-1 (RP4) (P1CMts) gewählt. Dieser Stamm wurde wie folgt präpariert. Der RP4-Faktor konnte mit einer Kreuzung auf Festmedium von R.lupini 1-20 (RP4) nach E.coli K12-1 : str-r übertragen werden, ein Stamm der anschließend mit P1CMts lysogenisiert wurde. Der Nachweis des RP4-Faktors und des P1-Prophagen geschah anhand der Resistenzmarkierungen amp-r, kan-r, tet-r und cam-r. Die Lysatgewinnung mit dem Stamm K12-1 (RP4) (P1CMts) erbrachte einen P1-Titer von $3,4 \times 10^8$ pfu. Da sich erfahrungsgemäß der P1-Phage nur sehr schwer titern läßt, kann dieser Wert mit einem größeren Fehler behaftet sein, der sich dann auch im folgenden Experiment auf die Berechnung der Multiplizität auswirkt.

IV D 1.2 P1-Transduktion des RP4-Faktors mit verschiedenen Multiplizitäten

Zur P1-Transduktion des RP4-Faktors wurde der Stamm K12 bis zu einem Titer von 4×10^8 kultiviert. Neben der Kontrolle ohne P1-Lysat wurden 3 Transduktionsansätze mit den Multiplizitäten $m = 1$, $m = 0,1$ und $m = 0,01$ durchgeführt. Nach Inkubation für 30 min bei 30°C erfolgte durch Zentrifugation

eine 5-fache Konzentrierung des Zellmaterials, das anschließend auf selektive Medien (PA + Amp, PA + Tet und LB + Cam) zur Erkennung des transduzierten RP4-Faktors und des P1CMts-Phagen ausplattiert wurde. In Tabelle II sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Man findet mit fallender Multiplizität eine Abnahme im Titer von ampicillin- und tetracyclin-resistenten Transduktanten. Auch die Lysogenisierungsrate nimmt mit fallender Multiplizität ab. Aus den angegebenen Daten der Tabelle II und dem Ausgangstiter kann man für $m = 1$ eine Lysogenisierungsrate von $1,6 \times 10^{-1}$ errechnen. Für die Transduktionsrate der amp-r Markierung ergibt sich ein Wert von $4,1 \times 10^{-5}$ und für die tet-r Markierung findet man $7,8 \times 10^{-5}$. Die Transduktion der kan-r Markierung wurde bei der Auswertung dieses Experiments nicht berücksichtigt, da sie keine wesentlich neuen Erkenntnisse liefert.

Tabelle II: P1-Transduktion des RP4-Faktors: Anzahl der resistenten Zellen pro ml Transduktionsgemisch in Abhängigkeit von der Multiplizität

Resistenzmarkierung	selektive Medien	Multiplizität		
		$m = 1$	$m = 0,1$	$m = 0,01$
cam-r	LB + Cam	$1,6 \times 10^8$	$4,9 \times 10^7$	$7,7 \times 10^6$
amp-r	PA + Amp	$4,1 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$
tet-r	PA + Tet	$7,8 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	$6,2 \times 10^2$

IV D 1.3 Analyse von ampicillin- und tetracyclinresistenten Transduktantenkolonien

Zur Analyse von ampicillin- und tetracyclinresistenten Transduktantenkolonien wurden diese auf sämtliche nicht-selektionierten Resistenzmarkierungen untersucht. Zu diesem Zweck wurde sowohl für die ampicillin- als auch für die tetracyclinresistenten Transduktanten pro Multiplizitätsstufe eine Ausgangsplatte mit Einzelkolonien angelegt, die nach Inkubierung bei 30°C auf die Platten PA + Amp, PA + Kan und PA + Tet überstempelt wurde. In Tabelle III ist die Auswertung dieser Stempelplatten wiedergegeben. Für die Tetracyclinresistenten Transduktantenkolonien findet man, daß sie jeweils alle Resistenzmarkierungen des RP4-Faktors besitzen. Die ampicillinresistenten Transduktantenkolonien zeigen dagegen nur in einigen wenigen Fällen den gesamten RP4-Faktor. Man kann für diese Transduktantenkolonien annehmen, daß sie einen dem RP4-1K analogen R-Faktor besitzen, der die Bezeichnung RP4-1T (T von Transduktion) erhalten soll. Diese unterschiedliche Terminologie erweist sich als gerechtfertigt, wenn man zusätzlich noch die Chloramphenicolresistenz der Transduktantenkolonien testet. Man findet für diese primär tetracyclin- und ampicillinresistenten Kolonien in Abhängigkeit von der Multiplizität ein vollkommen unterschiedliches Verhalten. In Kolonien mit der primär selektionierten Tetracyclinresistenz ist die *cam-r* Markierung des P1-Genoms mit unterschiedlicher Häufigkeit vorhanden. Sie nimmt von 90% bei $m = 1$ auf 22% bei $m = 0,1$ ab und verschwindet schließlich bei $m = 0,01$. Andererseits tragen Kolonien mit der primär selektionierten Ampicillinresistenz unabhängig von der Multiplizität stets die *cam-r* Markierung (Tabelle IV). Wie kann man diese Ergebnisse verstehen?

Tabelle III: P1-Transduktion des RP4-Faktors: Resistenzanalyse von Transduktantenkolonien in Abhängigkeit von der Multiplizität

primär selektio- nierte Resistenz- markierung	Stempel- platten	Anzahl der Kolonien auf den Stempelplatten in Abhängigkeit von der Multiplizität		
		m = 1	m = 0,1	m = 0,01
tet-r	PA	41	45	43
	PA + Amp	41	45	43
	PA + Kan	41	45	43
	PA + Tet	41	45	43
amp-r	PA	45	47	28
	PA + Amp	45	47	28
	PA + Kan	4	6	6
	PA + Tet	4	6	6

Tabelle IV: P1-Transduktion des RP4-Faktors: Chloramphenicolresistenz der Transduktantenkolonien

primär selektionierte Resistenzmarkierung ^{a)}	Prozentsatz chloramphenicolresistenter Transduktantenkolonien		
	m = 1	m = 0,1	m = 0,01
tet-r	90%	22%	0%
amp-r	100%	100%	100%

a) getestet wurden jeweils rund 50 Kolonien

Deutung der Ergebnisse für primär tetracyclinresistente Transduktantenkolonien:

In Zellen dieser Kolonien kann aufgrund von Doppelinfektion neben dem RP4-Faktor noch der P1-Prophage vorliegen. Dies läßt sich vor allem aus der Abhängigkeit von der Multiplizität folgern. Bei niedriger Multiplizität ($m = 0,01$) ist -wie im Experiment gezeigt- eine Doppelinfektion mit einem transduzierenden und einem echten P1-Phagen extrem unwahrscheinlich.

Deutung der Ergebnisse für primär ampicillinresistente Transduktantenkolonien:

Für diese Kolonien, in denen die amp-r und cam-r Markierung stets gemeinsam auftreten, kann das Modell der Doppelinfektion nicht gelten. Vielmehr muß man folgern, daß die beiden Resistenzgene mit einem P1-Phagenpartikel auf die Rezipientenzelle übertragen wurden. Unter "RP4-1T" soll deshalb ein DNA-Komplex verstanden werden, der neben der amp-r auch die cam-r Markierung trägt. Ein einfaches Modell hierfür wäre ein extrachromosomaler DNA-Ring, der für beide Resistenzen codiert. Diese Vorstellungen sollen im weiteren mit dem Begriff "RP4-1T-Faktor" verbunden werden.

IV D 2 Test des RP4-1T-Faktors auf P1-Markierungen

Den Prophagen P1CMts erkennt man in einer E.coli-Zelle aufgrund mehrerer Eigenschaften. Neben der Chloramphenicol-resistenz, die er seiner Wirtszelle verleiht, besitzt er noch einen temperatursensitiven Repressor und ein Restriktions-/Modifikations-System. Es soll nun getestet werden, ob diese Eigenschaften des P1-Genoms auch an RP4-11 tragenden Stämmen nachgewiesen werden können.

IV D 2.1 Nachweis des ts-Repressors und der P1-Phagen-vermehrung in RP4-1T-tragenden Stämmen

Den ts-Repressor des P1-Phagen kann man durch einen Temperatursprung der Flüssigkultur eines P1CMts-lysogenen Stammes von 32°C auf 42°C nachweisen. Die Bakteriensuspension wird sich aufgrund der durch die Phagenvermehrung hervorgerufenen Lyse der Zellen auflösen. Testet man dieses Zellsat auf lebensfähige P1-Phagen, so bekommt man gleichzeitig eine Aussage über die P1-Produktion von RP4-1T-tragenden Stämmen.

Zum Temperaturinduktionstest wurden mehrere E.coli-Stämme mit den extrachromosomalen Elementen RP4, P1CMts und RP4-1T verwendet. Eine Lyse der Bakterienkultur konnte immer dann beobachtet werden, wenn der betreffende Stamm das P1CMts- oder das RP4-1T-Plasmid enthielt (Abb. 1). Dieser Temperaturinduktionstest wurde nochmals an fünf unabhängig isolierten RP4-1T-tragenden E.coli-Stämmen mit positivem Erfolg wiederholt. Daraus kann man schließen, daß das RP4-1T-Plasmid neben der Ampicillinresistenz des RP4-Faktors und der Chloramphenicolresistenz des P1-Genoms auch noch das Gen für den ts-Repressor des P1-Genoms enthält. Aus diesem Experiment können aber noch weitere Schlüsse gezogen werden. Schließlich zeigt die bakterielle Lyse der E.coli-Zellen eine erfolgreich verlaufene Produktion des P1-Phagen an. Die Frage nach der Lebensfähigkeit der gebildeten P1-Phagen aus RP4-1T-tragenden Stämmen wurde durch Tropftests von Verdünnungsreihen der entsprechenden P1-Lysate auf Shigella-Rasen nachgeprüft. Dabei ergab sich, daß diese P1-Lysate einen Titer an lebensfähigen P1-Partikeln enthalten, der in der Größenordnung von 10^8 liegt und damit der normalen Rate der P1-Vermehrung (Abschnitt IV D 1.1) entspricht. Aus diesen Ergebnissen folgt, daß das RP4-1T-Plasmid die vollständige Information des P1-Phagen und zusätzlich noch die Ampicillinresistenz des RP4-Faktors beinhaltet.

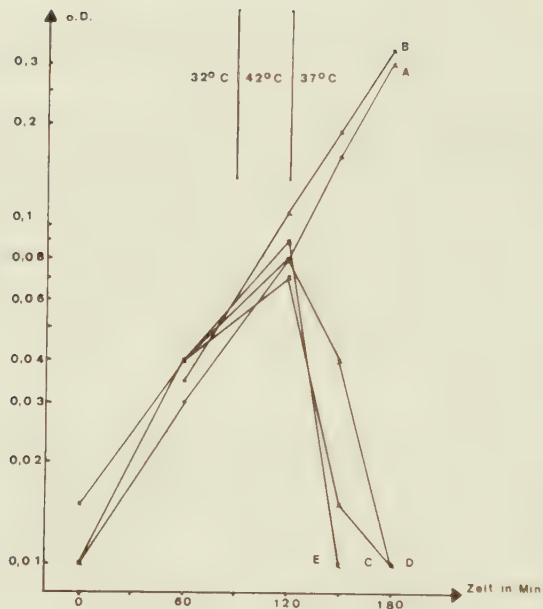


Abb. 1: Temperaturinduktion einiger E.coli Stämme:

Die E.coli-Stämme

- (A) K12
- (B) K12 (RP4)
- (C) K12 (P1CMts)
- (D) K12 (P1CMts) (RP4)
- (E) K12 (RP4-1T)

wurden der Prozedur der P1-Lysatgewinnung durch Temperaturinduktion unterworfen. Aufgetragen ist der Verlauf der optischen Dichte während der Anzuchtphase (32°C), der Induktionsphase (42°C) und der Phagenreifephase (37°C). Der Abfall der optischen Dichte zeigt die Lyse der Bakterienzellen zur Freisetzung der gebildeten P1-Phagen an.

IV D 2.2 Nachweis des amp-r Gens auf dem P1CMts-Genom in RP4-1T-tragenden Stämmen

Die bisher dargestellten Versuche schlagen für den RP4-1T-Faktor als Modell das P1CMts-Genom mit dem amp-r Gen des RP4-Faktors vor. Dieses Modell läßt sich mit einem weiteren sehr einfachen Versuch testen, denn P1-Phagen aus RP4-1T-tragenden Stämmen müßten nach Lysogenisierung ihren Wirtszellen sowohl eine Ampicillin- als auch eine Chloramphenicolresistenz verleihen. Dieser Versuch wurde durchgeführt: Der K12-Stamm wurde mit dem Lysat von einem RP4-1T-tragenden Stamm lysogenisiert und anschließend eine Verdünnungsreihe auf LB + Cam und LB + Amp Platten ausgespatelt. Durch Nachtesten der Resistenzen von Einzelkolonien ergab sich, daß alle chloramphenicolresistenten Kolonien ampicillinresistent waren und umgekehrt alle ampicillinresistenten Kolonien auch die Chloramphenicolresistenz besaßen.

IV D 2.3 Nachweis des Restriktionssystems des P1-Phagen in RP4-1T-tragenden Stämmen

Das Restriktionssystem des P1-Phagen ist mit der Plaquebildungsfähigkeit von λ -Phagen nachweisbar. Bekanntlich ist die Effektivität der Plaquebildung von λ -Phagen auf einem E.coli (P1)-Rasen um den Faktor 10^{-4} geringer als auf einem P1-freien E.coli-Rasen, falls der λ -Phage auf einem P1-freien E.coli-Stamm vermehrt wurde. In dem vorliegenden Experiment wurde eine Mutante des λ -Phagen (λ vir) verwandt, die aufgrund eines defekten Operators nicht mehr in den Prophagenzustand übergehen kann. Diese λ vir-Mutante wurde auf einem normalen K12-Stamm vermehrt (10^{10} pfu). Von dem Lysat wurden jeweils 0,1 ml auf unterschiedliche Indikatorrasen aufgetropft. In Tabelle V sind die Ergebnisse wiedergegeben. λ vir kann sich in normalen K12-Stämmen aufgrund des defekten Operators lytisch vermehren, desgleichen in einem K12 (RP4)-

Stamm. Enthält ein solcher K12-Stamm aber den Prophagen P1 oder RP4-1T, so ist λ vir zu keiner Plaquebildung mehr fähig. Der Grund hierfür liegt in dem P1-eigenen Restriktionssystem. Da λ vir in einem P1-freien Stamm gewachsen wurde, besitzt dieser Phage nicht die P1-Modifikation und wird deshalb in P1-lysogenen Zellen restringiert. Dieser Versuch zeigt, daß RP4-1-T auch das Restriktionssystem des P1-Phagen enthält. Damit ist die Aussage, daß RP4-1T die gesamte P1-Information enthält, erneut bestätigt.

IV D 2.4 Test des RP4-1T-Faktors auf RP4-Eigenschaften

In den bisherigen Versuchen wurde gezeigt, daß der RP4-1T-Faktor von den Resistenzmarkierungen des RP4-Faktors nur die Ampicillinresistenz übernommen hat. Zu prüfen bleibt noch, ob der RP4-1T-Faktor durch Konjugation übertragen werden kann und ob der PRR1-Phage eine E.coli-Zelle mit dem RP4-1-T-Faktor lysiert. Diese letzte Frage läßt sich schnell beantworten. Im Tropftest erzeugt eine PRR1-Suspension mit einem Titer von 10^9 auf einem RP4-1T-tragenden Weichagarrasen keine Lysezone. Der RP4-1T-Faktor besitzt also analog dem RP4-1K-Faktor kein Gen für PRR1-Sensitivität.

Wie steht es nun mit der Übertragbarkeit des RP4-1T-Faktors? Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Stämme K12 (RP4-1T) und NC22 : nal-r einem "interrupted mating"-Experiment unterworfen. Man findet, daß die Entwicklung resistenter Rezipientenkolonien auf ampicillin- und chloramphenicolhaltigen Platten vollkommen unterschiedlich verläuft (Abb. 2). Es entstehen bis zu einem Faktor 10 mehr ampicillinresistente Kolonien, die sich beim Nachtesten fast alle als chloramphenicolsensitiv erweisen (98%). Die chloramphenicolresistenten Kolonien sind dagegen alle auch ampicillinresistent. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß sich die Ampicillinresistenz des RP4-1T-Faktors verselb-

ständig und sich über einen "konjugationsähnlichen" Vorgang (vergl. Abschnitt IV E 5) auf den Rezipientenstamm überträgt. Dieser Schluß wird noch durch die Ergebnisse aus IV D 2.2 gestützt. Dort wird gezeigt, daß bei Lyso-genisierung durch P1-Phagen aus einem RP4-1T-tragenden Stamm der neuen Wirtszelle stets die Ampicillin- und Chloramphenicolresistenz gekoppelt verliehen wird. Das Auftreten einer isolierten Ampicillinresistenz muß also über einen von der Lysogenisierung unterschiedlichen Vorgang ablaufen. Es wird postuliert, daß es sich hierbei um den oben genannten "konjugationsähnlichen" Vorgang handelt.

Der Nachweis, daß bei Übertragung der Ampicillinresistenz die Anwesenheit von Donorzellen nötig ist, konnte in einem weiteren Experiment erbracht werden. Wiederholt man das vorherige "interrupted mating"-Experiment mit dem Überstand der Donorkultur nach niedertouriger Zentrifugation, so treten bis zu einem Faktor 100 weniger ampicillinresistente Rezipienten auf. Während die Anzahl chloramphenicolresistenter Rezipienten gleich bleibt. Die Übertragung der alleinigen Ampicillinresistenz verlangt also die Gegenwart von Donorzellen, während die Übertragung der Chloramphenicolresistenz offensichtlich über einen Lysogenisierungsvorgang durch den P1 verläuft. Die Frage nach der Übertragung des RP4-1T-Faktors muß also dahingehend beantwortet werden, daß aufgrund eines "konjugationsähnlichen" Vorgangs nicht der gesamte RP4-1T sondern nur die Ampicillinresistenz des RP4-1T-Faktors transferiert wird.

Es liegt nun die Vermutung nahe, daß die selbständig auftretende Ampicillinresistenz des RP4-1T-Faktors identisch mit dem RP4-1K-Faktor ist. Um dieser Frage nachzugehen, haben wir mit der im folgenden beschriebenen Kreuzung geprüft, ob sich die Ampicillinresistenz aus dem Stamm NC22 (amp-r) auf K12-1 : str-r übertragen läßt.

Je 0,1 ml von Donor- und Rezipientenkultur wurden gemeinsam auf einer PA-Platte ausgespatelt, bei 30°C bebrütet, am nächsten Morgen mit streptomycinhaltigem Wasser (2 ml) abgeschwemmt und eine Verdünnungsreihe davon auf PA-Platten mit Ampicillin- und Streptomycinzusatz ausgespatelt. Von 5 getesteten Donorstämmen übertrugen alle die Ampicillinresistenz mit einer sehr hohen Rate. Die abgeschwemmten Kreuzungsgemische enthielten in jedem Fall einen Titer $>10^9$ ampicillinresistenter K12-1-Rezipienten. Aufgrund dieser hohen Transferrate kann man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die selbständig auftretende Ampicillinresistenz des RP4-1T-Faktors mit dem RP4-1K-Faktor identisch ist.

Tabelle V: Plaquebildungsfähigkeit eines λ vir-Lysats auf verschiedenen E.coli-Stämmen

Indikatorrasen	Plaquebildung ^{a)}
K12	+
K12 (RP4)	+
K12 (PICMts)	-
K12 (PICMts) (RP4)	-
K12 (RP4-1T) ^{b)}	-
K12 (RP4-1T) ^{b)}	-
K12 (RP4-1T) ^{b)}	-
K12 (RP4-1T) ^{b)}	-

a) Zeichenerklärung: + konfluente Lyse im Tropfbereich
 - normales Wachstum des Indikatorrasens im Tropfbereich

b) vier unabhängig voneinander isolierte RP4-1T-tragende K12-Stämme

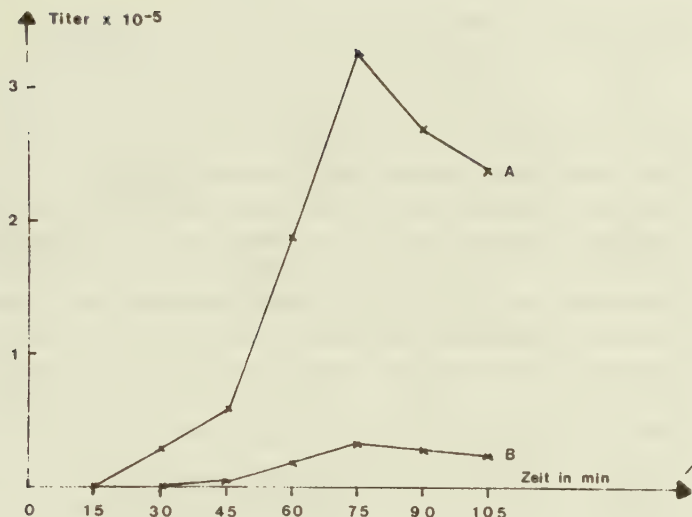


Abb. 2 : "Interrupted mating"-Experiment mit einem RP4-1T-tragenden Donorstamm

Der Donorstamm K12 (RP4-1T): amp-r, cam-r und der Rezipientenstamm NC22: nal-r wurden einem "interrupted mating"-Experiment unterworfen. Zur Gegenselektion des Donors diente Nalidixinsäure. Aufgetragen ist die Resistenzentwicklung der Rezipientenkolonien auf ampicillin- (A) und chloramphenicolhaltigen PA-Platten (B).

IV E Diskussion

IV E 1 Transduktion des RP4-Faktors mit dem P1-Phagen

Die Transduktion von R-Faktoren mit Hilfe von P1-Phagen ist schon seit längerer Zeit bekannt (Nakaya et al., 1960, Watanabe and Fukasawa; 1960). Falls der R-Faktor kleiner als das P1-Genom ist, wird er redundant im P1-Phagenkopf verpackt und erscheint in der Rezipientenzelle in seiner gewohnten Gestalt. Ist das R-Faktormolekül jedoch länger als das verpackte P1-Genom, so findet nur ein Teil des R-Faktors im Phagenkopf Platz. In diesem Fall besteht nach Transduktion die Möglichkeit verkürzte R-Faktoren zu isolieren (Shipley and Olsen, 1975). Da der RP4-Faktor mit einer Länge von 19,1 μm (Burkardt et al., 1974) deutlich kürzer als die verpackte P1-DNA (35,5 μm) ist (Ikeda und Tomizawa, 1968) sollten bei der Transduktion des RP4-Faktors keine Anomalien auftreten. Trotzdem findet man nach Transduktion auf selektiven Ampicillin-Platten neben dem RP4-Faktor eine alleinige Ampicillinresistenz, die etwa um den Faktor 10 häufiger auftritt. Für diese Ampicillinresistenz wurde ein weiterer R-Faktor verantwortlich gemacht und für ihn die Bezeichnung RP4-1T eingeführt.

IV E 2 Der RP4-1T-Faktor, ein intaktes P1-Genom mit einem zusätzlichen amp-r Gen

Die Analyse von Transduktanten mit einer alleinigen Ampicillinresistenz (RP4-1T) brachte das folgende überraschende Ergebnis. Sie alle besitzen -auch nach Transduktionsexperimenten mit sehr niedriger Multiplizität ($m = 0,01$)- das komplette P1CMts-Genom. Dazu wurden für RP4-1T-tragende Transduktanten folgende Eigenschaften nachgewiesen:

- Chloramphenicolresistenz (cam-r)
- Lyse nach Temperaturinduktion (ts-Repressor)
- P1-Restriktion von λ -Phagen

Diese Ergebnisse können nur so gedeutet werden, daß der RP4-1T-Faktor aus dem intakten P1CMts-Genom mit dem zusätzlichen amp-r Gen des RP4-Faktors besteht (Abb. 3). Diese Auffassung wird noch durch die Beobachtung gestärkt, daß RP4-1T-tragende Stämme lebensfähige P1-Phagen produzieren, die nach Lysogenisierung ihren Wirtszellen sowohl eine Chloramphenicol- als auch eine Ampicillinresistenz verleihen. Der RP4-1T-Faktor unterscheidet sich also grundlegend vom RP4-1K-Faktor.

IV E 3 Die RP4-1T-Entstehung nach der Transposon-Theorie

Nach Aufklärung der genetischen Struktur des RP4-1T-Faktors verbleibt noch die Frage nach seiner Entstehung. Der RP4-1T-Faktor ist nach P1-Transduktion des Resistenzfaktors RP4 mit relativ hoher Frequenz im Rezipienten nachzuweisen. Man muß annehmen, daß die Bildung des RP4-1T-Faktors im Donor geschieht, da im P1-Phagenkopf jeweils nur ein DNA-Fragment verpackt werden kann. Überraschend ist die Häufigkeit, mit der diese Fusion des amp-r Gens mit dem extrachromosomal vorliegenden P1CMts-Genom abläuft. Vergleicht man z. B. die Isolierung des cam-r tragenden P1-Genoms, so findet man, daß die Verlegung des Chloramphenicolresistenzgens auf das P1-Genom ein isoliertauftretendes Ereignis darstellt (Kondo und Mitsuhashi, 1964). Das Gen für die Ampicillinresistenz des RP4-Faktors muß deshalb auf einem speziellen DNA-Fragment liegen, das leicht von einem Replicon zum anderen wechseln kann. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Hedges und Jacob (1974) überein, die das Gen für Ampicillinresistenz des RP4-Faktors auf andere R-Faktoren verlegen konnten. Hedges und Jacob führten für ein solches spezielles DNA-Fragment den Begriff

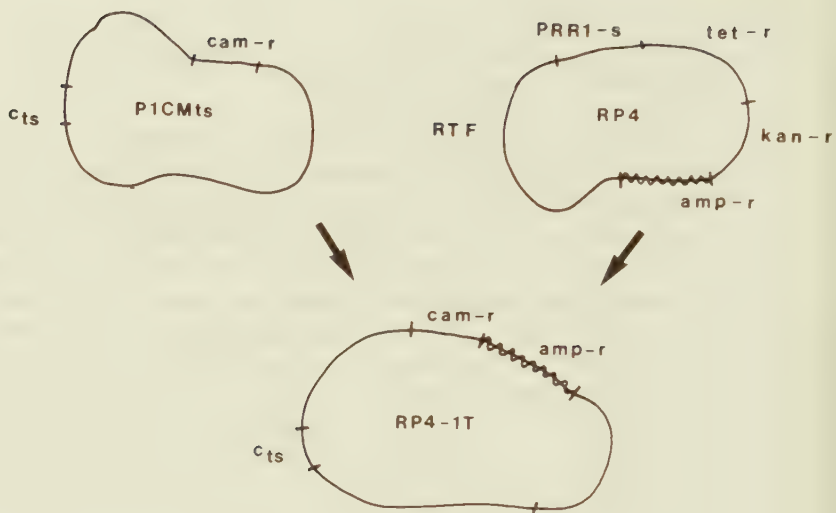


Abb. 3 : Die Entstehung des RP4-1T-Faktors

Die Darstellung zeigt die Entstehung des RP4-1T-Faktors durch Verschmelzung des *amp-r* Gens des RP4-Faktors mit dem P1CMts-Genom. Die genetischen Markierungen der Plasmide sind willkürlich angeordnet. Folgende Abkürzungen wurden benutzt:

- c_{ts}* : temperatursensitiver Repressor
- cam-r* : Chloramphenicolresistenz
- RTF : Resistenz-Transfereinheit
- PRR1-s: PRR1-Sensitivität
- tet-r* : Tetracyclinresistenz
- kan-r* : Kanamycinresistenz
- amp-r* : Ampicillinresistenz

"Transposon" ein. Ein Transposon ist also ein DNA-Fragment, das die Fähigkeit besitzt, mit hoher Frequenz von einem Replicon zum anderen zu wechseln.

Hedges und Jacob haben außerdem festgestellt, daß zur Verlegung des *amp^r* Gens die zelluläre *recA*-Funktion nötig ist. Das gleiche Ergebnis konnte von Krauß (1975) bei der Bildung des RP4-1T-Faktors erzielt werden. *recA⁻* Stämme produzieren keine RP4-1T-Faktoren.

Interessant ist noch die Frage, ob mit dem RP4 verwandte Resistenzfaktoren ebenfalls einen solchen Wechsel des *amp^r* Gens zum P1-Genom zeigen. Wir haben für dieses Experiment den RP8-Faktor benutzt, der nach Vergleich der AT-Karten den RP4-Faktor vollkommen enthalten sollte (Burkardt, 1974), haben aber nach Transduktion mit dem P1CMTs-Phagen keinen RP4-1T-ähnlichen Faktor isolieren können (Pühler, 1974; nicht veröffentlicht).

IV E 4 Welche Verwandtschaft besteht zwischen den Faktoren RP4-1K und RP4-1T ?

Die Faktoren RP4-1K und RP4-1T besitzen beide das Ampicillin-resistenzgen des RP4-Faktors. Weitere Gemeinsamkeiten können auf den ersten Blick nicht entdeckt werden. Während man vom RP4-1T-Faktor weiß, daß er das gesamte P1-Genom enthält, ist über den RP4-1K-Faktor nur sehr wenig bekannt. Ein Experiment trägt allerdings dazu bei, die Beziehung zwischen dem RP4-1T- und dem RP4-1K-Faktor aufzuklären. Verwendet man einen RP4-1T-tragenden Stamm als Donor in einem Konjugations-experiment, so tritt im Rezipienten mit großer Häufigkeit eine einzelne Ampicillinresistenz auf. Dieses Ergebnis kann man wie folgt deuten: Die Ampicillinresistenz des RP4-1T-Faktors kann sich verselbständigen und wird durch einen "konjugationsähnlichen" Vorgang auf den Rezipientenstamm übertragen. Diese selbständige Ampicillinresistenz hat sehr viel Ähnlichkeit mit dem RP4-1K-Faktor.

Insgesamt kommt man zu der folgenden Vorstellung: Der RP4-Faktor besitzt ein DNA-Fragment, das für eine transferierbare Ampicillinresistenz codiert. Dieses DNA-Fragment - Hedges und Jacob (1974) nannten es Transposon - kann zwischen verschiedenen Replicons wechseln. Im Falle von RP4-1T wird dieses DNA-Fragment vom RP4-Faktor auf das P1-Genom verlegt. Im Falle von RP4-1K ist das Wirtsreplicon dagegen nicht bekannt. Man kann jedoch annehmen, daß es sich hierbei um das E.coli-Chromosom handelt. Das Ampicillintransposon ist im RP4-1T-Faktor nicht fest verankert. Es kann sich wieder verselbständigen und durch einen "konjugations-ähnlichen" Vorgang auf andere Rezipienten übergehen. In diesem Fall nimmt es wahrscheinlich die Gestalt des RP4-1K-Faktors an.

Die Gemeinsamkeiten zwischen dem RP4-1K- und dem RP4-1T-Faktor bestehen also darin, daß es sich in beiden Fällen um das Ampicillintransposon des RP4-Faktors handelt, das in einem Fall das P1-Genom und im anderen Fall wahrscheinlich das E.coli-Chromosom als Replicon gewählt hat. Dieser Vorstellung widerspricht natürlich der in III E 1 diskutierte R-Faktorgestalt des RP4-1K-Faktors. Welcher Zustand für den RP4-1K-Faktor nun zutreffen mag - ein ins Chromosom integriertes Transposon oder ein extrachromosomaler DNA-Ring - läßt sich mit den vorliegenden genetischen Experimenten nicht entscheiden. Hier müssen molekularbiologische Experimente abgewartet werden, die zwischen diesen beiden Möglichkeiten differenzieren können.

IV E 5 Die Transferierbarkeit des Ampicillintransposons durch einen "konjugationsähnlichen" Vorgang

Die Transferierbarkeit des Ampicillintransposons wurde in den Abschnitten III D 4.2 und IV D 2.4 nachgewiesen. Man könnte für einen solchen Transfer einen Konjugationsvorgang verantwortlich machen und müßte dazu fordern, daß das Ampicillintransposon gleichzeitig auch eine RTF-Einheit enthält. Diesem Gedankengang muß man aber folgende Überlegung anschließen. Das gesamte Ampicillintransposon befindet sich auf dem P1-Genom und wird mit diesem im P1-Phagenkopf verpackt. Es ist bekannt, daß die im Phagenkopf verpackte DNA rund 12% Redundanz aufweist (Ikeda und Tomizawa, 1968). Ein Teil dieser redundanten DNA kann durch das Ampicillintransposon ersetzt werden. Damit läßt sich abschätzen, daß dieses Transposon eine Länge $< 4 \mu\text{m}$ besitzt. Ein DNA-Molekül von solcher Länge ist aber für die gesamte Information einer normalen RTF-Einheit zu kurz (Helinski und Clewell, 1971). Man muß folgern, daß der Transfer des Ampicillintransposons auf unübliche Weise verläuft und daß dazu weniger Information nötig ist, als sie die bekannten RTF-Einheiten aufweisen.

Auch diese Überlegungen führen zur Feststellung, daß das Transposon, bestehend aus einer Ampicillinresistenz und einer Transfereinheit, ein interessantes DNA-Element darstellt, welches Bakterienzellen über einen neuen Mechanismus die Erlangung von Resistenzgenen ermöglicht.

Am Eingang dieser Untersuchungen stand die Frage, ob der RP4-1K-Faktor unabhängig neben dem RP4-Faktor in der E.coli-Zelle existiert. Die Ergebnisse der P1-Transduktion zeigen deutlich, daß dies nicht der Fall ist, denn die Ampicillinresistenz des RP4-Faktors konnte nie als RP4-1K unabhängig vom RP4-Faktor transduziert werden. Für die Entstehung des RP4-1K-Faktors bedeutet dies, daß das Modell der unabhängigen Plasmide ausscheidet. Andererseits erbrachten die Transduktionsversuche mit dem P1-Phagen die Ausbildung des RP4-1T-Faktors. Daraus folgt, daß der Wechsel des Ampicillintransposons nichts mit einem Konjugationsvorgang zu tun hat. Das Abspaltungsmodell ist deshalb dem Konjugationsmodell vorzuziehen, wie dies schon in Abschnitt III E 3 vorweggenommen wurde.

Teil V:

Kompatibilitätsuntersuchungen zwischen dem RP4-Faktor
und den von ihm abgeleiteten R-Faktoren

		Seite
V	Kompatibilitätsuntersuchungen zwischen dem RP4-Faktor und den von ihm abgeleiteten R-Faktoren	147
V A	<u>Zusammenfassung</u>	150
V B	<u>Einleitung</u>	151
V C	<u>Material und Methoden</u>	152
V D	<u>Ergebnisse</u>	154
V D 1	RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante	154
V D 1.1	Isolierung und Charakterisierung von PRR1-resistenten, RP4-tragenden <u>E.coli</u> -Stämmen	154
V D 1.2	Isolierung und Charakterisierung von RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante	156
V D 2	Kompatibilitätsuntersuchungen zwischen dem RP4-Faktor und den von ihm abgeleiteten Plasmiden	161
V D 2.1	Methoden zur Kompatibilitäts- untersuchung von Plasmiden	161
V D 2.2	Kompatibilität zwischen RP4-1K und RP4-2	162
V D 2.3	Kompatibilität zwischen RP4-1T und RP4-2	163
V D 2.4	Kompatibilität zwischen RP4-Mutanten mit verkürzten r-Determinanten	165
V E	<u>Diskussion</u>	169
V E 1	PRR1-resistente RP4-Faktoren	169
V E 2	RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante	170

	Seite
V E 3	Kompatibilitätsuntersuchungen 171
V E 3.1	Kompatibilität zwischen RP4-2 und RP4-1K 171
V E 3.2	Kompatibilität zwischen RP4-2 und RP4-1T 172
V E 3.3	Kompatibilitätsexperimente zwischen RP4-Mutanten mit ver- kürzten r-Determinanten 172

Zur Durchführung dieser Arbeit wurden RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante (RP4-2: amp-s, RP4-3: kan-s und RP4-4: tet-s) isoliert. Solche RP4-Mutanten erhält man in E.coli nach Konjugationstransfer des RP4-Faktors bei Verwendung eines PRR1-resistenten, RP4-tragenden Donors und eines rekombinationsdefekten (recA) Rezipienten. Die erwähnte PRR1-Resistenz konnte auf dem RP4-Faktor lokalisiert werden. PRR1-resistente RP4-Faktoren zeigen gleichzeitig einen verringerten Konjugationstransfer.

Mit Kompatibilitätsuntersuchungen wurde gezeigt, daß die R-Faktorpaare RP4-2 / RP4-1K und RP4-2 / RP4-1T kompatibel sind. RP4-2 / RP4-4 und RP4-3 / RP4-4 können dagegen nicht gemeinsam in einer Zelle existieren. Konjugationsexperimente mit dem R-Faktorpaar RP4-2 / RP4-1K zeigten außerdem, daß RP4-1K unter die Kontrolle von RP4-2 gerät und nur gemeinsam mit diesem Faktor übertragen wird.

In den Teilen III und IV wurden Versuche beschrieben, die zur Aufklärung der genetischen Struktur des RP4-1K- und des RP4-1T-Faktors dienten. Beim RP4-1T-Faktor, der nach P1-Transduktion des Resistenzfaktors RP4 entsteht, handelt es sich um das Genom des P1-Phagen mit dem Ampicillin-transposon des RP4-Faktors. Der RP4-1K-Faktor dagegen entsteht nach Konjugationstransfer des RP4-Faktors. Er stellt eine isoliert auftretende Ampicillinresistenz dar, die mit dem Ampicillintransposon identisch sein kann.

In dieser Arbeit soll nun getestet werden, ob die R-Faktoren RP4-1K und RP4-1T mit dem RP4-Faktor kompatibel sind, d. h., ob sie gemeinsam in einer Zelle existieren können. Solche Versuche, die Auskunft über die Verwandtschaft der untersuchten R-Faktoren geben, sind mit dem in Teil I D 7 beschriebenen RP4-Mutanten möglich. Nimmt man z. B. die amp-s Mutante des RP4-Faktors (RP4-2), so kann man durch einfache Resistenztests die gleichzeitige Anwesenheit des RP4-2- und des RP4-1K- oder des RP4-1T-Faktors in einer Zelle nachweisen. Damit Untersuchungen dieser Art eine breitere Grundlage erhielten, wurden in E.coli RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante isoliert.

V C Material und Methoden

V C 1 Bakterienstämme und Bakteriophagen

Die verwendeten Bakterienstämme wurden in III C 1 (Tabelle I) beschrieben. Herkunft und Vermehrung des RP-spezifischen RNS-Phagen PRR1 können Abschnitt I C 3 entnommen werden.

V C 2 Der RP4-Faktor und die von ihm abgeleiteten
R-Faktoren

Die Herkunft des RP4-Faktors wurde in I C 2 beschrieben. Von ihm existieren die für diesen Teil der Arbeit wichtigen Abkömmlinge, die nach Bezeichnung, Resistenzen und Herkunft aufgelistet sind:

RP4-2	kan-r, tet-r	(I D 7, V D 1)
RP4-3	amp-r, tet-r	(I D 7, V D 1)
RP4-4	amp-r, kan-r	(V D 1)
RP4-1K	amp-r	(III D 1)
RP4-1T	amp-r, cam-r	(IV D 1)

V D 3 Medien

Sämtliche Medien und Zusätze sind im Abschnitt III C beschrieben. In diesem Teil treten zusätzlich Medien mit doppeltem Antibiotikazusatz auf, z. B. PA + Amp + Tet und PA + Kan + Tet.

Alle in dieser Arbeit verwandten Methoden wurden schon an anderer Stelle ausführlich beschrieben:

- RP4-Transfer in Flüssigmedium (s. III C 4)
- RP4-Transfer auf Festmedium (s. Abschnitt IV C 11):

Das Kreuzungsgemisch wird in diesem Verfahren durch Abschwemmen der Kreuzungsplatte mit 2 ml Puffer (PS: 0,07 M NaCl, 0,02 M KH_2PO_4 und 0,04 M Na_2HPO_4) geerntet. Die im Text angegebene Anzahl von resistenten Rezipientenzellen bezieht sich stets auf 1 ml des abgeschwemmten Kreuzungsgemisches.

- Resistenztest von Einzelkolonien durch Stempeln auf antibiotikahaltige Platten (s. Abschnitt III C 5)
- PRR1-Resistenztest durch Querstreichen des Pipettenausstrichs einer Bakterienkultur mit einem PRR1-Lysat (s. Abschnitt I C 14)
- PRR1-Lysetest durch Auftropfen eines PRR1-Lysats auf den Weichagarras des zu testenden Stammes:
Die Herstellung des Weichagarrasens erfolgte analog der Vorschrift aus Abschnitt IV C 6.

V D 1 RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante

Im Teil I D 7 dieser Arbeit wurde die Isolierung von RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante in R.lupini beschrieben. Solche RP4-Mutanten entstehen spontan mit einer Häufigkeit, die kein spezielles Selektionsverfahren benötigt. In E.coli-Zellen liegt der RP4-Faktor dagegen sehr stabil vor. RP4-Mutanten können nur nach Konjugationstransfer des RP4-Faktors unter erschwerten Bedingungen isoliert werden. Folgende Methode hat sich als erfolgreich erwiesen: Man benützt einen PRR1-resistenten, RP4-tragenden E.coli-Stamm und transferiert dessen RP4-Faktor nach einem recA-Rezipientenstamm. Die Isolierung des PRR1-resistenten, RP4-tragenden Ausgangsstammes wird im nächsten Abschnitt dargestellt.

V D 1.1 Isolierung und Charakterisierung von PRR1-resistenten, RP4-tragenden E.coli-Stämmen

Die Isolierung von PRR1-resistenten, RP4-tragenden E.coli-Stämmen soll unter Verwendung von K12 (RP4) beschrieben werden. Von diesem Stamm wurde ein Weichagarrasen angelegt und mit einem Tropfen PRR1-Suspension (Titer 10^9 pfu) versehen. Nach 24-stündiger Bebrütung zeigten sich in der Hemmzone des aufgetropften Lysats Einzelkolonien. Diese PRR1-resistenten Einzelkolonien wurden isoliert und durch Überstempeln auf Antibiotikaplatten auf die Resistenzen des RP4-Faktors geprüft. Von 50 getesteten Kolonien besaßen noch alle das Resistenzspektrum des RP4-Faktors. Diese isolierten Kolonien wurden nun nochmals durch Querstreichen von Ö-Kulturen mit einem PRR1-Lysat auf PRR1-Resistenz getestet (Abb. 1). Wie erwartet, konnte bei keinem dieser Stämme eine Lyse durch PRR1-Phagen festgestellt werden. Gezeigt werden muß noch, ob die PRR1-



Abb. 1: Lyse verschiedener E.coli Stämme durch den
RNS-Phagen PRR1

Von den Stämmen (1) E.coli K12 (RP4, PRR1-r), (2) E.coli K12 (RP4) und (3) E.coli K12 wurden Pipettenausstriche hergestellt und diese mit einer PRR1 Suspension quergestrichen. Der RP4-tragende E.coli Stamm (2) zeigt eine deutliche Lysezone. Innerhalb dieser Zone sind einzelne PRR1-resistente aber noch RP4-tragende Kolonien sichtbar. Testet man diese Kolonien z.B. Stamm (1) in der oben beschriebenen Weise, so beobachtet man keine Lysezone. Auch der Wildtyp E.coli K12 (3) wird von dem Phagen PRR1 nicht lysiert.

Resistenz auf dem RP4-Faktor codiert. Dazu wurde der RP4-Faktor aus einem PRR1-resistenten, RP4-tragenden Stamm auf einen neuen Wirt übertragen und dieser Wirt auf Lyse durch den PRR1-Phagen untersucht. Die folgenden Kreuzungen wurden für dieses Experiment in Flüssigmedium durchgeführt:

A) K12 (RP4): PRR1-s x K12-1: str-r

B) K12 (RP4): PRR1-r x K12-1: str-r

Die Ergebnisse sind in Tabelle I wiedergegeben. Man findet, daß PRR1-sensitive Donorstämme das RP4-Plasmid um den Faktor 100 häufiger übertragen als PRR1-resistente Donorstämme. Daraus kann man schließen, daß die PRR1-Resistenz mit einer herabgesetzten Transferrate des RP4-Faktors gekoppelt ist. Außerdem ist noch die Aufspaltung des RP4-Faktors interessant. In der Kreuzung mit einem PRR1-sensitiven Donor erweisen sich 50% der ampicillinresistenten Kolonien als RP4-tragend. Diese Zahl erhöht sich in der Kreuzung mit dem PRR1-resistenten Donor auf 95%. Nun zur eigentlichen Frage dieser Kreuzungen: Testet man RP4-tragende Rezipienten aus Kreuzung A und B, so können nur Rezipienten aus Kreuzung A vom Phagen PRR1 lysiert werden. Damit ist gezeigt, daß die PRR1-Resistenz auf dem RP4-Faktor codiert. Folgende Schreibweise ist also für den PRR1-resistenten RP4-Faktor gerechtfertigt: (RP4, PRR1-r).

V D 1.2 Isolierung und Charakterisierung von RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante

RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante erhält man in E. coli aus Kreuzungen von PRR1-resistenten, RP4-tragenden Donoren mit recA Rezipienten, z. B. aus der Kreuzung:

K12 (RP4, PRR1-r) x CSH 52: recA, str-r

Auch bei dieser Methode zur Isolierung von RP4-Mutanten ist kein spezielles Selektionsverfahren nötig, da RP4-Mutanten mit großer Häufigkeit auftreten. Unter 50 getesteten kanamycinresistenten Rezipienten dieser Kreuzung fanden sich 1 ampicillinsensitiver RP4-Faktor (RP4-2) und 4 tetracyclinsensitive RP4-Faktoren (RP4-4). Unter 50 tetracyclinresistenten Rezipienten wurden schließlich 2 kanamycinsensitive RP4-Faktoren (RP4-3) gefunden. Die *recA*-Mutation im Rezipienten ist dabei nicht unbedingt notwendig. Die beschriebenen RP4-Mutanten erhält man auch mit *recA*⁺-Rezipienten, allerdings nicht in vergleichbarer Häufigkeit.

Die Resistenzspektren dieser RP4-Mutanten können nochmals der Abbildung 2 entnommen werden. Neben dem Resistenzspektrum des RP4-Faktors ist das des RP4-1-, RP4-2-, RP4-3- und RP4-4-Faktors dargestellt. Das Fehlen bestimmter Antibiotikaresistenzen ist am Wuchsverhalten der einzelnen Stämme auf den unterschiedlichen Antibiotikaplatten zu erkennen.

Zur Charakterisierung der isolierten RP4-Mutanten wurden diese von CSH 52 nach NC22 transferiert. Verwendet wurde die Methode der Flüssigkreuzung. Nalidixinsäure diente zur Gegenselektion des Donorstammes. Die Ergebnisse dieser Kreuzung sind in Tabelle II zusammengefaßt. Die jeweiligen Resistenzspektren der RP4-Mutanten erklären die Transferaten der einzelnen Antibiotikaresistenzen: Eine ampicillinsensitive Mutante kann z. B. keine Ampicillinresistenz transferieren, usw.

Tabelle I: RP4-Transfer mit PRR1-sensitiven und PRR1-resistenten Donoren

Kreuzung	selektives Medium	Anzahl der Kolonie- bildner pro ml	1-Satz RP4-IK-tragender Rezipienten
A	PA + Amp + Str	$1,4 \times 10^5$	50%
	PA + Kan + Str	$5,6 \times 10^4$	0%
	PA + Tet + Str	$4,1 \times 10^4$	0%
B	PA + Amp + Str	$6,0 \times 10^3$	95%
	PA + Kan + Str	$4,0 \times 10^2$	0%
	PA + Tet + Str	$3,0 \times 10^2$	0%

Kreuzung A: K12 (RP4): PRR1-s x K12-1: str-r

Kreuzung B: K12 (RP4): PRR1-r x K12-1: str-r

Tabelle II: Transfer von RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante von CSH52 nach NC22:nal-r

	Anzahl der resistenten Rezipientenzellen pro ml auf den Antibiotikamedien		
	PA + Amp + Nal	PA + Kan + Nal	PA + Tet + Nal
CSH 52 (RP4-2): amp-s	0	$5,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$
CSH 52 (RP4-3): kan-s a)	$1,6 \times 10^4$	0	$6,3 \times 10^3$
CSH 52 (RP4-3): kan-s a)	$1,2 \times 10^4$	0	$3,5 \times 10^3$
CSH 52 (RP4-4): tet-s b)	$1,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	0
CSH 52 (RP4-4): tet-s b)	$5,0 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	0

a) und b): unabhängig voneinander isolierte Stämme

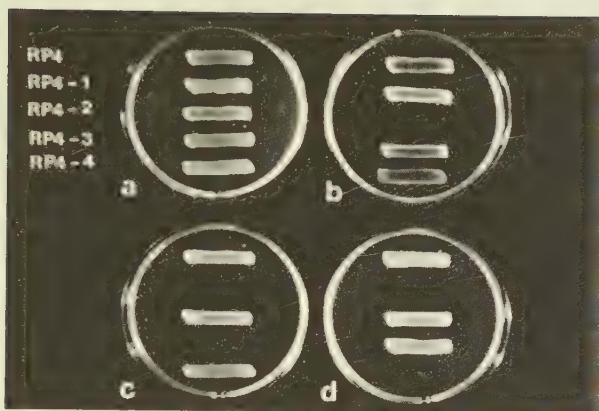


Abb. 2: Resistenzspektren von RP4-Mutanten in E.coli

Die Stämme CSH 52 mit den Resistenzfaktoren RP4, RP4-1K, RP4-2, RP4-3 und RP4-4 wurden mit der Öse auf PA (a), PA + Amp (b), PA + Kan (c) und PA + Tet (d) ausgestrichen und die Platten anschließend bei 37°C inkubiert. Am Wachstum der Wirtsstämme kann man die Resistenzspektren der RP4-Mutanten ablesen. RP4-1K besitzt nur noch das Gen amp-r. RP4-2 erweist sich als amp-s, RP4-3 als kan-s und RP4-4 als tet-s.

Testet man die transferierten RP4-Faktoren mit Hilfe von Stempelmethoden auf ihre Resistenzspektren, so findet man keine Veränderung gegenüber dem Donorstamm. Interessant ist noch die Stabilität der verschiedenen RP4-Mutanten in CSH52. Für RP4-2 (ampicillinsensitiv) und RP4-4 (tetracyclinsensitiv) wurde unter 5×10^8 Zellen keine einzige Rückmutante entdeckt. Analoge Untersuchungen an RP4-3 (kanamycinsensitiv) scheitern an der Ausbildung einer chromosomalen Kanamycinresistenz in E.coli (Apirion und Schlessinger, 1968). Damit ist die Beschreibung der Isolierung und Charakterisierung von RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante abgeschlossen.

V D 2 Kompatibilitätsuntersuchungen zwischen dem
 RP4-Faktor und den von ihm abgeleiteten Plasmiden

Nach Isolierung von RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante wurden Kompatibilitätsuntersuchungen zwischen den folgenden R-Faktorpaaren durchgeführt:

- I) RP4-2: amp-s, kan-r, tet-r und RP4-1K: amp-r
- II) RP4-2: amp-s, kan-r, tet-r und RP4-1T: amp-r, cam-r
- III) RP4-3: amp-r, kan-s, tet-r und
 RP4-4: amp-r, kan-r, tet-s
- IV) RP4-2: amp-s, kan-r, tet-r und
 RP4-4: amp-r, kan-r, tet-s

Im Fall I soll die Kompatibilitätsuntersuchung zeigen, ob der in vieler Hinsicht interessante RP4-1K-Faktor neben dem RP4-2-Faktor in der Bakterienzelle bestehen kann. Im Fall II erwartet man, daß das Pl-Genom mit dem amp-r Gen des RP4-Faktors aufgrund unterschiedlicher Replikationssysteme mit dem RP4-2-Faktor koexistiert. Für Fall III und IV dagegen kann man vorhersagen, daß hier keine Koexistenz möglich ist, da es sich jeweils um den gleichen R-Faktortyp nur mit unterschiedlichen Resistenzgenen handelt. In den nächsten Punkten werden diese Kompatibilitätsexperimente ausführlich geschildert.

V D 2.1 Methoden zur Kompatibilitätsuntersuchung
 von Plasmiden

Der erste Schritt einer Kompatibilitätsuntersuchung ist die Konstruktion von Bakterienstämmen, die die zu untersuchenden Plasmide gemeinsam tragen. In den vorliegenden Fällen gelang dies durch einfache Konjugationsexperimente auf Festagar. Die zu untersuchenden Plasmidpaare unterschieden sich jeweils durch Antibiotikaresistenzen. Ihr gemeinsames Vorliegen in einer Zelle konnte durch Verwendung spezieller Selektionsmedien, die zwei Antibiotika

enthielten, erkannt werden. Anschließend wurde getestet, ob die gemeinsam vorliegenden Plasmide in einer Bakterienzelle koexistieren können, d. h., ob sie stabil vorliegen oder ob sich Segreganten ergeben, die entweder das eine oder das andere Plasmid beinhalten. Zu diesem Zweck wurden von ausgewählten Kolonien nach Übernachtskulturen Einzelkolonien hergestellt und diese auf die entsprechenden Resistenzmarkierungen getestet.

In einigen Fällen wurde das unabhängige Vorliegen von 2 Plasmiden nochmals durch ein Konjugationsexperiment nachgeprüft. Verwendet man als Donoren nämlich Stämme, die 2 Plasmide tragen, so sollten diese beiden Plasmide durch Konjugationstransfer getrennt werden.

V D 2.2 Kompatibilität zwischen RP4-1K und RP4-2

Zur Untersuchung der Kompatibilität zwischen RP4-1K und RP4-2 wurden die Stämme CHS 51 (RP4-1K): amp-r und K12 (RP4-2): amp-s, kan-r, tet-r einem Konjugationsexperiment auf Festagar unterworfen. Als Selektionsmedium diente PA + Amp + Tet. Pro ml Kreuzungssuspension wurden $2,6 \times 10^7$ Zellen gefunden, die auf diesem Selektionsmedium wachsen konnten, also offensichtlich beide Plasmide trugen.

Zur Frage der Koexistenz dieser Plasmide ergab sich, daß beide in einer E.coli-Zelle stabil vorliegen. Untersucht wurden 5 ausgewählte Kolonien. In keinem Fall konnten Segreganten mit nur einem Plasmid entdeckt werden. Zum Nachweis von zwei unabhängigen Plasmiden in diesen Zellen wurde nochmals ein Konjugationstransfer durchgeführt. Als Donor wurde ein E.coli K12 Stamm ausgewählt, der sowohl die amp-r, als auch die kan-r und tet-r Markierung trug. In Tabelle III sind die Transferfrequenzen der einzelnen Resistenzmarkierungen angegeben. Testet man diese resistenten Rezipientenzellen auf die restlichen

Antibiotikamarkierungen, so findet man, daß zwei Typen von resistenten Rezipienten auftreten. Der eine Typ enthält nur den RP4-2-Faktor, der andere dagegen besitzt wiederum sämtliche RP4-Resistenzen, müßte also sowohl den RP4-2 als auch den RP4-1K-Faktor beinhalten (Tabelle IV). Überraschend ist hierbei das Ergebnis, daß der RP4-Faktor nicht alleine übertragen wird, sondern immer nur im Zusammenhang mit dem RP4-2-Faktor auftritt. Man kann daraus den Schluß ziehen, daß der RP4-1K-Faktor unter die Kontrolle des RP4-2-Faktors gerät und daß der RP4-1K-Faktor nur zusammen mit dem RP4-2-Faktor übertragen wird. Diese Untersuchungen liefern das Ergebnis, daß die R-Faktoren RP4-1K und RP4-2 in einer Bakterienzelle koexistieren können. Sie gehören also nicht zur gleichen Kompatibilitätsklasse.

V D 2.3 Kompatibilität zwischen RP4-1T und RP4-2

Die Stämme K12 (RP4-1T): amp-r, cam-r und K12 (RP4-2): amp-s, kan-r, tet-r wurden für die Kompatibilitätsuntersuchungen der Faktoren RP4-1T und RP4-2 verwandt. Nach einem Kreuzungsexperiment dieser beiden Stämme auf Festagar konnten auf dem Selektionsmedium PA + Amp + Tet resistente Kolonien mit einem Titer von $1,1 \times 10^6$ Zellen pro ml Kreuzungssuspension isoliert werden. Diese Kolonien bestanden offensichtlich aus Zellen, die die beiden zu untersuchenden Plasmide trugen.

Die Koexistenz dieser beiden Plasmide wurde wieder mit dem Segregationsexperiment geprüft. Auch hier konnten keine Kolonien entdeckt werden, die entweder das eine oder das andere Plasmid allein trugen. Wie schon vermutet, können die Plasmide RP4-1T und RP4-2 in einer Bakterienzelle koexistieren.

Tabelle III: R-Faktortransfer mit einem E.coli-Donorstamm, der sowohl den RP4-1K- als auch den RP4-2-Faktor trägt

Kreuzung a)	Anzahl der resistenten Rezipientenzellen pro ml Kreuzungssuspension selektioniert auf den Medien:		
	PA + Amp + Nal	PA + Kan + Nal	PA + Tet + Nal
K12 (RP4-1K) (RP4-2) x NC22: nal-r	$1,4 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$

a) Der R-Faktortransfer wurde auf Festmedium durchgeführt

Tabelle IV: Test der resistenten Rezipientenkolonien aus dem Versuch der Tabelle III auf Ampicillin-, Kanamycin- und Tetracyclinresistenz

resistente NC22-Rezipientenkolonie ^c	getestet auf: b)		
selektioniert auf: a)	PA + Amp + Nal	PA + Kan + Nal	PA + Tet + Nal
PA + Amp + Nal	100%	100%	100%
PA + Kan + Nal	30%	100%	100%
PA + Tet + Nal	32%	100%	100%

a) Untersucht wurden jeweils 50 Kolonien

b) Angegeben ist der Prozentsatz resistenter Kolonien

In einem weiteren Konjugationstransfer wurde nachgewiesen, daß die Plasmide RP4-1T und RP4-2 wirklich unabhängig in einer E.coli-Zelle vorliegen. Der R-Faktor RP4-2 konnte nämlich auf den Rezipientenstamm NC22 übertragen werden. RP4-1T dagegen, das extrachromosomale P1-Genom mit der amp-r des RP4-2-Faktors, wurde nicht transferiert (Tabelle V und VI).

Diese Untersuchungen zeigen, daß RP4-1T und RP4-2 kompatibel sind, also gemeinsam in einer E.coli-Zelle koexistieren können und damit unterschiedlichen Kompatibilitätsklassen angehören.

V D 2.4 Kompatibilität zwischen RP4-Mutanten mit verkürzten r-Determinanten

Die Kompatibilität zwischen RP4-2 und RP4-4 sowie zwischen RP4-3 und RP4-4 wurde mit den folgenden Kreuzungen getestet:

- A) K12 (RP4-2): kan-r, tet-r x CSH 51 (RP4-4): amp-r, kan-r
- B) K12 (RP4-3): amp-r, tet-r x CSH 51 (RP4-4): amp-r, kan-r

Beide Kreuzungen wurden auf Festagar durchgeführt. In Kreuzung A) diente PA + Amp + Tet als Selektionsmedium. Pro ml Kreuzungssuspension wurden $0,8 \times 10^6$ Zellen gefunden, die auf dem angegebenen Selektionsmedium Kolonien bilden konnten. Diese Kolonien sollten demnach die beiden in Frage kommenden Plasmide tragen. Für Kreuzung B) wurde als Selektionsmedium PA + Kan + Tet verwendet. Hier ergab sich ein Titer von $1,7 \times 10^6$ doppeltresistenter Zellen pro ml Kreuzungssuspension, die wiederum zur Koloniebildung auf dem Selektionsmedium fähig waren.

Tabelle V: R-Faktortransfer mit einem E.coli-Donorstamm, der sowohl den RP4-IT- als auch den RP4-2-Faktor trägt

Kreuzung a)	Anzahl der resistenten Rezipientenzellen pro ml Kreuzungssuspension auf den Medien:		
	PA + Amp + Nal	PA + Kan + Nal	PA + Tet + Nal
K12 (RP4-IT) (RP4-2) x NC22:nal-r	1×10^5	$7,8 \times 10^6$	$6,4 \times 10^6$

a) Der R-Faktortransfer wurde auf Festmedium durchgeführt

Tabelle VI: Test der resistenten Rezipientenkolonien aus dem Versuch der Tabelle V auf Ampicillin-, Kanamycin- und Tetracyclinresistenz

resistente NC22-Rezipientenzellen selektioniert auf: a)	getestet auf: b)		
	PA + Amp + Nal	PA + Kan + Nal	PA + Tet + Nal
PA + Kan + Nal	0%	100%	100%
PA + Tet + Nal	0%	100%	100%

a) Untersucht wurden jeweils 50 Kolonien

b) Angegeben ist der Prozentsatz resistenter Kolonien

Die Kompatibilität dieser RP4-Mutanten folgt nun aus ihrem Segregationsverhalten. Je 5 Kolonien der Kreuzung A) mit dem R-Faktorpaar RP4-2 und RP4-4 wurden als Ö-Kultur angezogen und davon jeweils 50 Einzelkolonien isoliert, die dann auf die gesamten RP4-Resistenzen getestet wurden. Aus dem Resistenzspektrum läßt sich bestimmen, ob die individuelle Zelle den RP4-2, den RP4-4 oder beide RP4-Mutanten besitzt. Das Ergebnis ist in Tabelle VII angegeben. Man findet, daß der überwiegende Prozentsatz der Zellen jeweils nur noch eine der beiden RP4-Mutanten enthält. Ein analoges Ergebnis erzielt man auch für die Kompatibilität der RP4-Mutanten RP4-3 und RP4-4, falls man Kolonien der Kreuzung B) einem analogen Segregationsversuch unterwirft. In Tabelle VIII ist das Ergebnis aus diesem Versuch zusammengefaßt. Zumindest 2 Kolonien zeigen eine starke Aufspaltung, sie produzieren Segreganten, die entweder die RP4-Mutanten RP4-3 oder RP4-4 beinhalten. Eine Kolonie dagegen widersetzt sich dieser Aufspaltung. Für sie könnte man argumentieren, daß es sich hierbei um eine Rekombinante aus den beiden ursprünglichen RP4-Mutanten handelt. Insgesamt zeigen diese Versuche aber klar, daß RP4-Mutanten in den angegebenen Kombinationen in einer Zelle nicht koexistieren können und deshalb nicht kompatibel sind, also einer Kompatibilitätsklasse angehören.

Tabelle VII: Segregationsverhalten der R-Faktoren aus dem Stamm K12 (RP4-2) (RP4-4)

Stamm K12 (RP4-2) (RP4-4)	Prozentsatz der individuellen Zellen mit den R-Faktoren		
	RP4-2	RP4-4	RP4-2 und RP4-4
Kolonienummer			
1	70%	18%	12%
2	86%	6%	8%
3	92%	8%	0%
4	90%	8%	2%
5	92%	6%	2%

Tabelle VIII: Segregationsverhalten der R-Faktoren aus dem Stamm K12 (RP4-3) (RP4-4)

Stamm K12 (RP4-3) (RP4-4)	Prozentsatz der individuellen Zellen mit den R-Faktoren		
	RP4-3	RP4-4	RP4-3 und RP4-4
Kolonienummer			
1	0%	0%	100%
2	0%	2%	98%
3	0%	2%	98%
4	40%	42%	18%
5	46%	50%	4%

Eine RP4-tragende E.coli-Zelle wird normalerweise von dem RP-spezifischen RNS-Phagen PRR1 lysiert. Bei einem Tropf-test einer PRR1-Suspension auf einen K12 (RP4)-Rasen konnten aus dem Lysebereich allerdings Einzelkolonien isoliert werden, die den RP4-Faktor besitzen, aber nicht mehr PRR1-sensitiv sind. Hierbei handelt es sich um RP4-Mutanten, die eine bestimmte Information verloren haben, die der PRR1-Phage zum Befall der Zelle oder zu seiner Vermehrung benötigt. Durch Transferexperimente konnte nachgewiesen werden, daß diese PRR1-Resistenz RP4-codiert vorliegt. Solche PRR1-resistente RP4-Faktoren zeichnen sich außerdem durch eine herabgesetzte Transferfrequenz aus. Analoge Beobachtungen wurden von Olsen und Shipley (1975) für PRR1-resistente RP1-Faktoren beschrieben.

Die Kopplung zwischen PRR1-Resistenz und herabgesetztem Transfer kann man wie folgt erklären: Bei dem PRR1-Phagen handelt es sich um einen dem MS2 oder Q_β-analogen RNS-Phagen (Olsen und Thomas, 1973). Es ist nun bekannt, daß MS2 und Q_β an F-ähnliche Pili von E.coli-Zellen adsorbieren und dadurch den Infektionsvorgang einleiten. Ein analoger Infektionsmechanismus wurde auch für den PRR1-Phagen vorgeschlagen. Er soll an den RP-spezifischen Pilus des RP4-Faktors adsorbieren (Bradley, 1974). Ein PRR1-resistenter RP4-Faktor könnte demnach einen veränderten Pilus besitzen, an dem erstens der PRR1-Phage nicht mehr adsorbiert und der zweitens für eine herabgesetzte Transferfrequenz verantwortlich ist. Diese Überlegungen zeigen, daß die Wechselwirkung des PRR1-Phagen mit dem RP4-Faktor geeignet ist, weitere Erkenntnisse über das Transfersystem des RP4-Faktors zu gewinnen.

RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante erhält man in E.coli bei einem RP4-Transfer unter erschwerten Bedingungen, z. B. bei Verwendung eines PRR1-resistenten RP4-Faktors und einem recA-Rezipientenstamm. Es ist nicht geklärt, warum gerade diese Kombination eine so hohe Rate an RP4-Mutanten liefert. Man kann jedoch vermuten, daß u. U. PRR1-resistente RP4-Faktoren aufgrund ihres veränderten Pilus eine fragile Konjugationsbrücke ausbilden und daß durch eine Art von "interrupted mating" verkürzte RP4-Moleküle entstehen. Die Rolle des recA-Rezipienten ist ebenfalls ungeklärt. Der recA-Rezipient ist zu keiner normalen Rekombination fähig. Bei der Zyklisierung eines transferierten RP4-Faktors handelt es sich demnach um einen recA-unabhängigen Vorgang. Existieren nun im RP4-Molekül mehrere Stellen, an denen eine solche Zyklisierung möglich ist, so könnte man sich vorstellen, daß bei einer fehlerhaften Zyklisierung Antibiotikaresistenzen verlorengehen. Wahrscheinlich läuft der molekulare Vorgang der RP4-Mutantenausbildung in der Endphase sowohl bei E.coli als auch bei R.lupini vollkommen analog ab. Ein geschädigtes RP4-Molekül zyklisiert unter Verlust von Antibiotikaresistenzen.

Zur Charakterisierung dieser RP4-Mutanten mit verkürzter r-Determinante wurden Konjugationsexperimente durchgeführt. Die jeweils fehlenden Resistenzmarkierungen konnten im Rezipienten nicht nachgewiesen werden. Rückmutationstests zeigten übrigens, daß eine einmal verlorengegangene Resistenz nicht wiedergewonnen werden kann. All diese Ergebnisse stimmen mit der Annahme überein, daß die Mutationsausbildung über eine Deletion im RP4-Molekül verläuft.

V E 3 Kompatibilitätsuntersuchungen

V E 3.1 Kompatibilität zwischen RP4-2 und RP4-1K

Nach einem Konjugationsexperiment mit Elternstämmen, die zum einen den RP4-2-Faktor (amp-s, kan-r und tet-r) und zum anderen den RP4-1K-Faktor (amp-r) trugen, konnten auf einem speziellen Selektionsmedium Kolonien isoliert werden, die wiederum die gesamten RP4-Resistenzen besaßen. Für diese Kolonien kann man annehmen, daß sie sowohl den RP4-2- als auch den RP4-1K-Faktor beinhalten. Ein Segregations-experiment zeigte, daß die RP4-Resistenzen jeweils stabil von einer Zelle auf ihre Nachkommen vererbt werden, d. h., daß keine Segreganten auftreten, die entweder den einen oder den anderen Faktor beinhalten.

Interessant war nun ein weiteres Experiment zur Trennung dieser beiden Plasmide durch Konjugationstransfer. In diesem Experiment konnten Rezipientenzellen mit den beiden Plasmiden oder nur mit dem RP4-2-Faktor isoliert werden. Der RP4-1K-Faktor wurde einzeln nicht vorgefunden. Diese Ergebnisse lassen folgende Aussagen zu:

- 1) Zumindest der RP4-2-Faktor kann durch Konjugation abgetrennt werden.
- 2) Der RP4-1K-Faktor kommt dagegen unter die Kontrolle des RP4-2-Faktors. Hierdurch wird ein alleiniger Transfer des RP4-1K-Faktors verhindert. Zusammen mit dem RP4-2-Faktor kann der RP4-1K-Faktor allerdings transferiert werden.

Auch für diesen Befund existieren in der Zwischenzeit Parallelen in der Literatur. Olsen und Shipley haben 1975 berichtet, daß ein R-Faktor, der die Ampicillinresistenz des RP1-Faktors trägt, vom RP1-Faktor in seiner Fertilität inhibiert wird.

Man könnte die vorliegenden Ergebnisse in Form von molekularen Modellen interpretieren, doch liegen hierfür noch zu wenig Ergebnisse vor. Trotzdem bietet die Wechselwirkung des RP4-1K-Faktors mit dem RP4-Faktor einen interessanten Ansatzpunkt zur Beantwortung der Frage nach Herkunft und Ursprung des RP4-1K-Faktors.

Insgesamt kann man rein formal zur Kompatibilität die Aussage treffen, daß RP4-1K und RP4-2 kompatibel sind. Ein analoges Verhalten zeigen die beiden genannten R-Faktoren, die Olsen und Shipley (1975) beschrieben haben.

V E 3.2 Kompatibilität zwischen RP4-2 und RP4-1T

Der Kompatibilitätstest zwischen den R-Faktoren RP4-2 und RP4-1T bestätigt die Vorstellungen, die von den beiden Faktoren vorlagen. RP4-2, eine Mutante des RP4-Faktors, zeigt keinerlei Verwandtschaft mit dem RP4-1T-Faktor, dem P1-Genom mit dem amp-r Gen des RP4-Faktors. Beide Faktoren sind kompatibel. Konjugationsexperimente zur Trennung der beiden Plasmide erbrachten nur RP4-2-tragende Rezipienten. Der RP4-1T-Faktor konnte aufgrund einer fehlenden RTF-Einheit nicht weiter transferiert werden. Auch der RP4-2-Faktor konnte das RP4-1T-Plasmid nicht mobilisieren.

V E 3.3 Kompatibilitätsexperimente zwischen RP4-Mutanten mit verkürzten r-Determinanten

Bei diesen Experimenten handelt es sich um Kontrollexperimente, denn RP4-Mutanten können aufgrund einer strengen Replikationskontrolle in einer Bakterienzelle nicht koexistieren. Die Versuche bestätigen diese Vorstellung. E.coli-Zellen mit verschiedenen RP4-Mutanten bilden Segreganten, die jeweils nur einen RP4-Mutantentyp beinhalten.

Schlußbetrachtung

In den 5 Teilen dieser Arbeit wurde das Verhalten des Resistenzfaktors RP4 in dem Bodenbakterium R.lupini und dem Enterobakterium E.coli dargestellt. Man erkennt, daß das Erscheinungsbild eines Resistenzfaktors stark von seiner Wirtszelle abhängt. In R.lupini liegt der RP4-Faktor instabil vor. Von ihm können ohne speziellen Selektionsdruck mit hoher Effektivität Mutanten isoliert werden. Außerdem inhibiert er die R.lupini-eigene Konjugation und induziert im geringen Maße chromosomalen Gentransfer. In E.coli liegen die auffallendsten Eigenschaften des RP4-Faktors dagegen auf einem ganz anderen Sektor. Hier entpuppt sich die Ampicillinresistenz des RP4-Faktors als ein interessantes genetisches Element. Diese Ampicillinresistenz kann mit großer Häufigkeit vom RP4-Faktor auf das P1-Genom wechseln und zeigt damit die Struktur eines Transposons. Andererseits ist diese Ampicillinresistenz auch transferierbar. Sie überträgt sich unabhängig vom RP4-Faktor oder dem P1-Genom auf Rezipientenstämme und offenbart damit die Grundzüge eines autonomen Resistenzfaktors. Im weiteren ergaben Kompatibilitätsexperimente, daß diese isoliert auftretende Ampicillinresistenz mit dem RP4-Faktor kompatibel ist und daß dabei ihr Transfer unter die Kontrolle des RP4-Faktors gerät.

Diese Untersuchungsergebnisse, die in vielerlei Hinsicht völlig neue Erkenntnisse auf dem R-Faktorgebiet lieferten, benötigen in einigen Punkten noch eine molekularbiologische Bestätigung. In R.lupini kann z. B. die Mutantenausbildung des RP4-Faktors durch einen hypothetischen Deletionsprozeß im RP4-Molekül mittels Längenmessungen an RP4-Mutanten oder Heteroduplexstudien zwischen Mutanten und dem Wildtyp des RP4-Faktors nachgeprüft werden. Auch das Ampicillintransposon des RP4-Faktors sollte noch molekularbiologisch

charakterisiert werden. Hierzu können elektronenmikroskopische Untersuchungen an dem P1-Phagengenom mit und ohne Ampicillinresistenz dienen. Möglich sind Längenmessungen, AT-Kartierungen und Heteroduplexstudien an den genannten DNA-Spezies. Von molekularbiologischem Interesse ist auch die Struktur der isoliert auftretenden Ampicillinresistenz. Da sie extrachromosomal in der CCC-Form nicht isoliert werden konnte, liegt sie entweder in der OC-Form oder integriert ins Bakterienchromosom vor. Die OC-Form läßt sich durch Sedimentation im Saccharosegradienten auffinden, die Integration ins Bakterienchromosom kann dagegen durch Hybridisierungsexperimente nachgewiesen werden. Die meisten dieser skizzierten molekularbiologischen Experimente sind zur Zeit in Arbeit. Es ist zu erwarten, daß ihre Ergebnisse die auf genetischem Wege gewonnenen Ergebnisse untermauern und weiter zur Klärung der aufgeworfenen Probleme beitragen.

Zum Schluß möchte ich noch auf einige Punkte eingehen, die die Sonderstellung des RP4-Faktors erklären. Hierzu gehört der wichtige Befund, daß sich der RP4-Faktor als Trägerplasmid für Fremdgene zur genetischen Manipulation in Bakterien eignet. Jacob und Grinter haben 1975 nachgewiesen, daß das Restriktionsenzym EcoRI den RP4-Faktor nur einmal schneidet und damit das ringförmige Plasmid zur Integration von Fremdgenen öffnet. Andererseits läßt sich der RP4-Faktor nach E.coli-Zellen transformieren, wenn diese vorher einer Ca^{++} -Behandlung unterworfen wurden (Pühler, 1975, nicht veröffentlicht). Damit besteht die Möglichkeit, mit Hilfe des RP4-Faktors Fremdgene in E.coli zu etablieren und diese dann durch Konjugation auf andere Bakterienarten zu übertragen.

Der große Wirtsbereich des RP4-Faktors gibt andererseits Anlaß dazu, diesen Resistenzfaktor zur Konstruktion von Konjugationssystemen für chromosomale Gene in beliebigen gram⁻Bakterien zu benutzen. Folgende Vorstellungen wurden hierzu entwickelt: Man integriert mittels genetischer Mani-

pulation ein Stück chromosomale DNA in den RP4-Faktor, etabliert diesen manipulierten RP4-Faktor in dem entsprechenden Bakterienstamm und kann dann hoffen, daß dieser aufgrund der Basenhomologie an das Wirtschromosom ankoppelt und beim eigenen Transfer chromosomale Gene mitüberträgt. Diese Technik wird zur Zeit in Rhizobium leguminosarum erfolgreich angewandt (Berenger, 1975).

Resistenzfaktoren haben sich innerhalb weniger Jahre zu einem bevorzugten Untersuchungsobjekt der molekularen Genetik entwickelt. Vor allem die Technik der genetischen Manipulation eröffnet ein weites Feld anwendungsorientierter Forschung, wobei die Auswirkungen solcher Experimente sowohl im Positiven als auch im Negativen heute noch nicht abzuschätzen sind (siehe dazu auch den Aufruf von 11 Mitgliedern der National Academy of Sciences: Sciences 185, 303 (1974)). Was den RP4-Faktor betrifft, so ist zu erwarten, daß er aufgrund seines enormen Wirtsbereichs und seiner genetischen Manipulierbarkeit auf diesem Forschungsbereich eine wesentliche Rolle spielen wird. Unter Umständen gelingt es, mit diesem RP4-Faktor, die zur Zeit noch auf E.coli beschränkten Manipulationsexperimente auf sämtliche gram⁻ Bakterien auszudehnen.

Anhang I

Zusammenstellung der Abkürzungen

ade	: Gen für Adeninbiosynthese
Amp	: Ampicillin
amp-r	: ampicillinresistent
amp-s	: ampicillinsensitiv
ara	: Gen für Arabinoseabbau
Cam	: Chloramphenicol
cam-r	: chloramphenicolresistent
car-l	: Carotinoid:weiß (leukos)
car-p	: Carotinoid:rosa (pink)
car-y	: Carotinoid:gelb (yellow)
CB-r	: carbenicillinresistent
CCC	: (<u>c</u> ovalently <u>c</u> losed <u>c</u> ircle) konvalent geschlossener DNA-Ring
CM	: Chloramphenicol
CsCl	: Cäsiumchlorid
cys	: Gen für Cysteinbiosynthese
DNA	: Desoxyribonukleinsäure (<u>d</u> eoxyribo- <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
E.coli	: <u>Escherichia coli</u>
EthBr	: Äthidumbromid
F, F-Faktor	: Fertilitätsfaktor bei <u>E.coli</u>
F'	: (F-prime) Fertilitätsfaktor in <u>E.coli</u> mit integrierten chromosomalen Genen
Fc	: Fertilitätsfaktor für die c-Region des <u>R.lupini</u> -Chromosoms
Fd	: Fertilitätsfaktor für die d-Region des <u>R.lupini</u> -Chromosoms
fi	: Fertilitätsinhibierung (<u>f</u> ertility <u>i</u> n- hibition) bezüglich der <u>E.coli</u> Fertilität

fin	: Gen für Inhibierung der <u>R.lupini</u> -Fertilität auf dem RP4-Faktor
gram ⁻	: Gramfärbung:negativ
Hfr	: (<u>h</u> igh <u>f</u> requency of <u>r</u> ecombination) ein ins Chromosom integrierter F-Faktor
his, hisC	: Gen (C) für Histidinbiosynthese
ilv	: Gen für Isoleucin-Valin-Biosynthese
Kan	: Kanamycin
kan-r	: kanamycinresistent
kan-s	: kanamycinsensitiv
LB	: Luria Broth
leu	: Gen für Leucinbiosynthese
Leu	: Leucin
log	: logarithmisch
log-Phase	: logarithmische Phase
m	: Multiplizität
met	: Gen für Methioninbiosynthese
Met	: Methionin
MHK	: minimale Hemmkonzentration
MM	: Minimalmedium
n.a.	: nicht auswertbar
Nal	: Nalidixinsäure
nal-r	: nalidixinsäureresistent
NB	: Nutrient Broth
NM-r	: neomycinresistent
OC	: (<u>o</u> pen <u>c</u> ircle) offener DNA-Ring
o.D.	: optische Dichte
p	: rosa (<u>p</u> ink)
PA	: Penassay
P.aeruginosa:	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>
pdx	: Gen für Pyridoxinbiosynthese
pfu	: plaquebildende Einheiten (<u>p</u> laque <u>f</u> orming <u>u</u> nits)
pro	: Gen für Prolinbiosynthese

PRR1-r	: Resistenz einer Zelle gegenüber dem RNS-Phagen PRR1
PRR1-s	: Sensitivität einer Zelle gegenüber dem RNS-Phagen PRR1
prt	: prototroph
r-Determinante	: Resistenzdeterminante
rec	: Rekombinanten
recA	: Gen A für Rekombination
rev	: Revertante
R-Faktor	: Resistenzfaktor
rif-r	: rifamicinresistent
R.lupini	: <u>Rhizobium lupini</u>
RNA	: Ribonukleinsäure (<u>ribo</u> <u>nucleic</u> <u>acid</u>)
RNS	: Ribonukleinsäure
RTF-Einheit	: Resistenztransfereinheit
sta	: Sternbildungsfähigkeit (<u>s</u> tarforming <u>a</u> bility)
stat	: stationär
Str	: Streptomycin
str-r	: streptomycinresistent
str-s	: streptomycinsensitiv
s-Wert	: Sedimentationskonstante
TC-r	: tetracyclinresistent
Tet	: Tetracyclin
tet-r	: tetracyclinresistent
tet-s	: tetracyclinsensitiv
thi	: Gen für Thiaminbiosynthese
thr	: Gen für Threoninbiosynthese
thy	: Gen für Thyminbiosynthese
Thy	: Thymin
tra	: Transfereigenschaft
ts	: temperatursensitiv
Ü-Kultur	: Übernachtkultur
vir	: virulent
y	: gelb (<u>y</u> ellow)

Anhang II

Literaturverzeichnis

Akiba, T., T. Kojoma, Y. Isshiki, S. Kimura, R. Fukishina:
Studies on the mechanism of development of multiple drug
resistent Shigella strains.

Nihon Jji Shimo 1886, 45 (1960)

Apirion, D. and D. Schlessinger:

Coresistance to neomycin and kanamycin by mutations in
an Escherichia coli locus that affects ribosomes.

J. Bacteriol. 96, 768-776 (1968)

Benveniste, R. and J. Davies:

Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria.

Ann. Rev. Biochem. 42, 471-506 (1973)

Berenger, J. E.:

R Factor Transfer in Rhizobium leguminosarum.

J. Gen. Microbiol. 84, 188-198 (1974)

Berenger, J. E.:

persönliche Mitteilung (1975)

Bradley, D. E.:

Adsorption of Bacteriophages Specific for Pseudomonas
aeruginosa R Factor RP1 and R1822.

Biochem. Biophys. Res. Communications 57, 3, 893-900 (1974)

Burkardt, H. J.:

Genetische Untersuchungen zur Transmission des R-Faktors
RP4 in Rhizobium lupini

Diplomarbeit, Universität Erlangen (1972)

Burkardt, H. J.:

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an
bakteriellen Resistenzfaktoren der Klasse P.
Dissertation, Universität Erlangen (1974)

Burkardt, H. J., R. E. Mattes, A. Pühler und W. Heumann:
Arbeit in Vorbereitung (1975)

Chabbert, Y. A. and J. G. Baudens:

Transmissible resistance to six groups of
antibiotics in Salmonella infections.
Antimicrobiol. Agents and Chemother. 380-383 (1965)

Chandler, P. M. and V. Krishnapillai:

Phenotypic properties of R factors of Pseudomonas
aeruginosa: R factors transferable only in Pseudo-
monas aeruginosa.
Genet. Res. 23, 521-527 (1974)

Cho, J. J., N. J. Panapoulos and M. M. Schroth:

Genetic Transfer of Pseudomonas aeruginosa R Factors
to Plant Pathogenic Erwinia spp.
J. Bacteriol. 122, 1, 192-198 (1975)

Datta, N.:

Transmissible drug resistance in an epidemic strain
of Salmonella typhimurium.
J. Hyg., Camb. 60, 301-310 (1962)

Datta, N., R. W. Hedges, Elizabeth J. Shaw, R. B. Sykes
and M. H. Richmond:

Properties of an R Factor from Pseudomonas aeruginosa.
J. Bacteriol. 108, 3, 1244-1249 (1971)

Davis, B. D. and E. S. Mingioli:

Mutants of Escherichia coli requiring methione or vitamin B12.
J. Bact. 60, 17, (1950)

Demerec, M., E. A. Adelberg, A. J. Clark and P. E. Hartmann:
A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics.
Genetics 54, 61-76 (1966)

Goebel, W.:

Extrachromosomale DNA in Bakterien.
Angew. Chemie 85, 13, 569-580 (1973)

Grinstedt, J., J. R. Saunders, L. C. Ingram, R. B. Sykes
and M. H. Richmond:

Properties of an R Factor which Originated in Pseudo-
monas aeruginosa 1822.

J. Bacteriol. 110, 2, 529-537 (1972)

Finnegan, D. and N. Willets:

The site of action of F-transfer inhibitor.

Mol. Gen. Genet. 127, 307-316 (1973)

Hedges, R. W.:

persönliche Mitteilung (1971)

Hedges, R. W. and A. E. Jacob:

Transposition of Ampicillin Resistance from RP4 to
Other Replicons.

Molec. Gen. Genet. 132, 31-40 (1974)

Helsinki, D. R. and D. B. Clewell:

Circular DNA.

Ann. Rev. Biochem. 40, 899-942 (1971)

Heumann, W.:

Conjugation in Starforming Rhizobium lupini.

Molec. Gen. Genet. 102, 132-144 (1968)

Heumann, W., A. Pühler and Erika Wagner:

The two transfer regions of the Rhizobium lupini conjugation
I. Fertility factor elimination and one way transfer.

Molec. Gen. Genet. 113, 308-315 (1971)

Heumann, W., A. Pühler and Erika Wagner:

The two transfer regions of the Rhizobium lupini conjugation
II. Genetic Characterization of the transferred chromosomal
segments.

Molec. Gen. Genet. 126, 267-274 (1973)

Holloway, B. W. and M. H. Richmond:

R factors used for genetic studies in strains of Pseudo-
monas aeruginosa and their origin.

Genet. Res. 21, 103-105 (1973)

Ikeda, H. and J. I. Tomizawa:

Prophage P1, an Extrachromosomal Replication Unit
Cold Spring Harbor Symposium Vol XXXIII 791-798 (1968)

Ingram, L., R. B. Sykes, J. Grinsted, J. R. Saunders
and M. H. Richmond:

A Transmissible Resistance Element from a Strain of
Pseudomonas aeruginosa Containing No Detectable Extra-
chromosomal DNA.

J. Gen. Microbiol. 72, 269-279 (1972)

Jacob, F. and J. Monod:

Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins.
J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)

Jacob, A. E. and N. J. Grinter:

Plasmid RP4 as a vector replicon in genetic engeneering.
Nature 255, 504-506 (1975)

Kabins, S. A. and S. Cohen:

Resistance transfer factor in Enterobacteriaceae.
New Engl. J. Med. 275, 248-252 (1966)

Klingmüller, W.:

Bakterielle Resistenzfaktoren als Vektoren für Gen-
manipulation und Genterapie.

Münch. med. Wschr. 117, 24, 1051-1060 (1975)

Kondo, E. and S. Mitsuhashi:

Drug resistance of enteric bacteria. IV. Active transducing bacteriophage P1CM produced by the combination of R-factor with bacteriophage P1.

J. Bacteriol. 88, 1266-1267 (1964)

Krauß, G.:

Diplomarbeit in Vorbereitung (1975) Univ. Erlangen

Lebek, G.:

Übertragung der Mehrfachresistenz gegen Antibiotika und Chemotherapeutika von E.coli auf andere Species gramnegativer Bakterien.

Experimenteller Beitrag Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.

189, 213-223 (1963)

Lebek, G.:

Die infektiöse, bakterielle Antibiotikaresistenz.

Verlag Hans Huber, Bern (1969)

Lebek, G.:

Persönliche Mitteilung (1974)

Lowbury, E. J. L., A. Kidson, H. A. Lilly, G. D. J. Ayliffe and R. J. Jones:

Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to antibiotics:

Emergence of strains highly resistant to carbenicillin.

Lancet ii 448-452 (1969)

Mattes, R.:

Analyse des Thymidin-Stoffwechsels, Thymidin-abhängiger Mutanten und der molekularen Gestalt des Resistenzfaktors RP4 in Rhizobium lupini.

Dissertation, Universität Erlangen (1974)

Mattes, R., H. J. Burkardt, W. Heumann and A. Pühler:
R-factors from Pseudomonas aeruginosa investigated in
Rhizobium lupini and Escherichia coli.
Genetics 74, No. 2, Part 2, 114 (1973)

Mayer, F.:

Die Fimbrien von Rhizobium lupini 1-50, sta⁻.
Arch. Mikrobiologie, 68, 179-186 (1969)

Meynell, E., G. G. Meynell and N. Datta:

Phylogenetic Relationships of Drug-Resistance Factors
and Other Transmissible Bacterial Plasmids.
Bact. Rec. 32, 1, 55-83 (1968)

Miller, J. H.:

Experiments in Molecular Genetics
Cold Spring Harbor Laboratory (1972)

Nakaya, R., A. Nakamura and Y. Murata:

Resistance transfer agents in Shigella.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 654-659 (1960)

Novick, R. P.:

Extrachromosomal Inheritance in Bacteria.
Bact. Rec. 33, 2, 210-235 (1969)

Ochiai, K., K. Yamanaka, K. Kimura and O. Sawada:

Studies on the inheritance of drug resistance between
Shigella and Escherichia coli strains.
Nihon Jji Shimpō 1861, 34 (1959)

O'Gara, F. and L. K. Dunican:

Transformation and Physical Properties of R-Factor
RP4 Transferred from Escherichia coli to Rhizobium trifolii.
J. Bacteriol. 116, 3, 1177-1180 (1973)

Olsen, R. H. and Patricia Shipley:

Host Range and Properties of the Pseudomonas aeruginosa
R-Factor R1822.
J. Bacteriol. 113, 2, 772-780 (1973)

Olsen, R. H. and Deanna D. Thomas:

Characteristics and Purification of PRR1, an RNA Phage Specific for the Broad Host Range of Pseudomonas R1822 Drug Resistance Plasmid.

J. Virol. 12, 6, 1560-1567 (1973)

Olsen, R. H. and Gonzalez:

Escherichia coli Gene Transfer to unrelated Bacteria by a Histidine Operon - RP1 Drug Resistance Plasmid Complex.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 1, 377-385 (1974)

Olsen, R. H. and Patricia L. Shipley:

RP1 Properties and Fertility Inhibition Among P, N, W and X Incompatibility Group Plasmids.

J. Bacteriol. 123, 1, 28-35 (1975)

Panopoulos, N. J., W. V. Guimaraes, J. J. Cho and M. N. Schroth:

Conjugational Transfer of Pseudomonas aeruginosa R-Factors to Plant Pathogenic Pseudomonas spp.

in Druck (1975)

Perret, C. J.:

Iodometric assay of penicillinase.

Nature (London) 174, 1012-1013 (1954)

Pühler, A.:

Die Kompetenz von Donor und Rezipient in der R.lupini Konjugation
Dissertation, Universität Erlangen (1971)

Pühler, A., H. J. Burkardt, R. E. Mattes und W. Heumann:

Genetische Untersuchungen an Resistenzfaktoren der Klasse P
in Rhizobium lupini

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 228, 168-174 (1974)

Richmond, M. H. and R. B. Sykes:

The chromosomal integration of a β -lactamase gene derived from the P-type R-factor RP1 in Escherichia coli.

Genet. Res. 20, 231-237 (1972)

Rosner, J. L.:

Formation, Induction and Curing of Bacteriophage P1 Lysogens.

Virology, 49, 679-689 (1972)

Stanisich, Vilma and B. W. Holloway:

Chromosome Transfer in Pseudomonas aeruginosa mediated by R-Factors.

Genet. Res. 17, 169-172 (1971)

Shipley, P. and R. H. Olsen:

Isolation of a nontransmissible antibiotic resistance plasmid by transductional shortening of R-factor RP1.

J. Bacteriol. 123, 20-27 (1975)

Tucher, R.:

Untersuchungen an RP4-DNA in Minizellen von Rhizobium lupini.

Dissertation, Universität Erlangen (1974)

Watanabe, R. and R. Fukasawa:

Episome resistance factors in Enterobacteriaceae. II.

Transduction of resistance factors in Escherichia coli and Salmonella typhimurium.

Med. Biol. (Tokyo) 56, 64-67 (1960)

Watanabe, T.:

Infective Heredity of Multiple Drug Resistance in Bacteria.

Bact. Rev. 27, 87-115 (1963)

Watanabe, R., H. Nishida, C. Ogata, T. Arai and S. Sato:

Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. VII. Two types of naturally occurring R factors.

J. Bacteriol. 88, 716-726 (1964)

Herrn Prof. Dr. W. Heumann möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen. Er hat mich in das Gebiet der Bakteriengenetik eingeführt und mich bestärkt, eine Arbeit über bakterielle Resistenzfaktoren anzufertigen. Seine Anregungen und Diskussionen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen beiden technischen Assistentinnen, Frau U. Maier-Wollburg und Frä. B. Vollrath, bin ich sehr zu Dank verpflichtet, da sie mit großem Geschick und viel Fleiß die dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuche durchgeführt haben.

Herr Dr. H. J. Burkardt, Herr Dr. R. E. Mattes, Herr Dr. R. Tucher und Frau Marianne Spitzbarth haben in ihren Dissertationen die molekularbiologische Seite des RP4-Faktors behandelt. Ihre Ergebnisse ergänzen die vorliegende Arbeit und erlaubten in vielen Fällen eine eindeutige Interpretation der durchgeführten Versuche. Ich möchte mich deshalb auch bei ihnen für ihre erfolgreiche Mitarbeit bedanken.

Nicht zuletzt gebührt mein Dank all den Mitgliedern des Instituts, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich denke hier besonders an Frau W. Cimander (Nährbodenküche), Frau B. Görg (Photolabor), Frau A. Hofmann und Frau M. E. Schmidt (Sekretariat).

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hugi, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990